



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Faculdade de Ciências

Uma nova via sintética para *N*-óxidos de quinolina

Caracterização estrutural e avaliação biológica

Melani Joana Almeida Reis

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Química Medicinal

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Paulo Jorge da Silva Almeida

Coorientador: Prof. Doutor Samuel Martins Silvestre

Covilhã, outubro de 2018

Ao meu afilhado, Tiago

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador, o Professor Doutor Paulo Almeida, por toda a ajuda, paciência, dedicação, pela sua presença diária e acima de tudo por todos os conhecimentos que me transmitiu.

De igual forma, quero agradecer ao meu coorientador, o Professor Doutor Samuel Silvestre, por todo apoio, esclarecimento de dúvidas e pela sua presença ao longo deste trabalho de dissertação.

Ao Professor Doutor Renato Boto um obrigado por todo o esclarecimento acerca da ressonância magnética nuclear.

À D. Dulce, à D. Ana e ao Sr. João agradeço pela disponibilidade que sempre tiveram durante este percurso.

À Joana e ao João por toda a ajuda no laboratório, pela ajuda na síntese química e na avaliação biológica, a qual foi sem dúvida bastante importante.

Ao Octávio, por toda ajuda e disponibilidade que sempre demonstrou.

À Carmina e à Margarida por me terem ajudado sempre, essencialmente nos dias em que as coisas corriam menos bem.

À Marta e ao Pedro por me ajudarem em tudo, pelos momentos partilhados e acima de tudo por toda amizade demonstrada, jamais esquecerei tudo o que fizeram por mim.

Ao Luís, pela paciência, apoio e acima de tudo por estar sempre presente.

Por último, mas sem dúvida o mais importante, quero agradecer aos meus pais, irmã, sobrinho e ao meu cunhado, por todo o apoio, pela força que me deram para nunca desistir. Foram sem dúvida o meu suporte para que concluísse esta etapa.

Resumo

A química medicinal moderna tem-se mostrado fundamental no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Neste contexto, os *N*-óxidos de quinolina e as quinolinas têm despertado cada vez mais interesse aos químicos medicinais, uma vez que estes núcleos estão presentes em compostos bioativos, nomeadamente antibacterianos, antiparasitários, antimaláricos e anticancerígenos.

No decorrer da investigação laboratorial conducente a esta dissertação, em que se pretendia generalizar a obtenção de novos benzoisoxazol-3-ilidenos anteriormente descrita para 5-(benzoisoxazol-3-ilideno)pirimidinas, verificou-se a formação inesperada de *N*-óxidos de quinolina durante a redução de 2-nitrobenzilidenos (cíclicos e acíclicos) e de 2-nitrofenilmetilenos. Neste contexto, é aqui proposta e desenvolvida uma nova via sintética que permite a formação seletiva de *N*-óxidos de quinolina. Assim, na presença de um agente redutor ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), o grupo nitro é parcialmente reduzido, formando-se uma hidroxilamina intermediária, a qual permite uma ciclização intramolecular com posterior eliminação de água, originando assim o *N*-óxido de quinolina correspondente.

Adicionalmente, 5-(benzoisoxazol-3-ilideno)pirimidinas, os *N*-óxidos e os precursores sintetizados foram testados *in vitro* como inibidores da xantina oxidase e foi avaliada a sua citotoxicidade numa linha celular do cancro da mama (MCF-7) e em fibroblastos normais da derme humana (NHDF). Dos resultados obtidos, destaca-se um dos precursores, 5,5'-((2-nitrofenil)metileno)bis(1,3-dietil-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1*H*,5*H*)-diona) (**7g**), o qual apresenta um elevado potencial como inibidor da xantina oxidase (concentração inibitória a 50% = 6,1 μM). Assim, é necessária uma avaliação futura dos parâmetros cinéticos e mecanísticos de inibição desta enzima por parte deste composto, bem como a preparação de novos análogos para um melhor entendimento da respetiva relação estrutura-atividade. Relativamente aos estudos de citotoxicidade, destaca-se o (*E*)-3-(2-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**6j**) o qual levou a uma baixa proliferação (2,4%) das células MCF-7 a 30 μM . A este dado acresce o facto de não apresentar marcada citotoxicidade em NHDF, mostrando-se seletivo para a linha tumoral estudada. Aos ensaios de avaliação *in vitro* acresceram estudos complementares *in silico*, nomeadamente estudos de *docking* molecular e de ADMET.

Palavras-chave

N-óxidos de quinolina, 2-nitrobenzilidenos, nova via sintética, ação anti proliferativa, inibição da xantina oxidase.

Abstract

Modern medicinal chemistry has been fundamental in the discovery and development of new drugs. In this context, quinoline *N*-oxides and quinolines have increasingly aroused interest for medicinal chemists, since these nuclei are present in bioactive compounds, namely antibacterial, antiparasitic, antimalarial and anticancer drugs.

In the course of the laboratory investigation conducing to this dissertation, in which it was intended to generalize the application of the previously described preparation of new benzisoxazoles, it was observed the unexpected formation of quinoline *N*-oxides during the reduction of 2-nitrobenzylidenes (cyclic and acyclic) and 2-nitrophenylmethylenes. In this context, a new synthetic route is proposed and developed here, allowing the selective formation of quinoline *N*-oxides. Thus, in the presence of a reducing agent ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), the nitro group is partially reduced, forming an intermediate hydroxylamine, which allows an intramolecular cyclization with subsequent elimination of water, affording the corresponding quinoline *N*-oxide.

In addition, the synthesized 5- (benzisoxazol-3-ylidene) pyrimidines, *N*-oxides and precursors were tested *in vitro* as xanthine oxidase inhibitors of and their cytotoxicity was assessed in a breast cancer cell line (MCF-7) and normal human dermal fibroblasts (NHDF). From the results obtained, it can be stated that one of the precursors, 5,5'-((2-nitrophenyl)methylene)bis(1,3-diethyl-2-thioxodihydropyrimidine-4,6(1*H*, 5*H*)-dione) (**7g**), has a high potential as a xanthine oxidase inhibitor (half-maximal inhibitory concentration = 6.1 μM). Thus, it is necessary a future evaluation of the kinetic and mechanistic parameters of the inhibition of this enzyme by this compound, as well as the preparation of new analogues for a better understanding of the respective structure-activity relationships. In the cytotoxicity studies it was observed that (*E*)-3-(2-nitrophenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one (**6j**) led to a low relative cell proliferation (2.4%) of MCF-7 cells at 30 μM . As this compound does not presented marked cytotoxicity in NHDF its seem to be selective for the studied tumor line. Additional *in silico* studies, in particular molecular docking and ADMET previsions, were added to the *in vitro* evaluation assays.

Keywords

Quinoline *N*-oxides, 2-nitrobenzylidenes, new synthetic route, antiproliferative action, xanthine oxidase inhibition.

Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. A Química Medicinal e o desenvolvimento de fármacos	2
1.1.1. Estudos <i>in silico</i> - <i>docking</i> molecular e predição de propriedades ADMET	4
1.1.2. Ensaios <i>in vitro</i> - Estudos de proliferação celular e inibição da atividade da XO	8
1.2. Quinolinas	10
1.2.1. Síntese de derivados de quinolina di-substituídos	13
1.2.2. Síntese de derivados de quinolina tri-substituídos	14
1.2.3. Síntese de derivados de quinolina cíclicos	15
1.2.4. Redução de <i>N</i> -óxidos de quinolina	17
1.3. <i>N</i> -óxidos de Quinolinas	17
1.3.1. Síntese de <i>N</i> -óxidos de Quinolinas por oxidação direta de quinolinas	19
1.3.2. Síntese de <i>N</i> -óxidos de Quinolinas por heterociclização	20
Capítulo 2 - Objetivos	22
Capítulo 3 - Resultados e discussão	24
3.1. Síntese	25
3.1.1. 5-(2-Nitrobenzilideno)pirimidinas 3a-c	26
3.1.2. 5-(Benzisoxazol-3-ilideno)pirimidinas 4a-b	29
3.1.3. 2-Nitrobenzilidenos derivados de 1,3-dicarbonilos cíclicos 6a-k	32
3.1.3.1. 2-(2'-Nitrobenzilideno)ciclohexan-1,3-diona (6a)	32
3.1.3.2. 2,2-Dimetil-5-(2-nitrobenzilideno)-1,3-dioxan-4,6-diona (6b)	33
3.1.3.3. 2-(2-Nitrobenzilideno)-1 <i>H</i> -inden-1,3(2 <i>H</i>)-diona (6c)	35
3.1.3.4. Tentativas para a síntese de 5,5-dimetil-2-(2-nitrobenzilideno)ciclohexan-1,3-diona (6d)	36
3.1.3.5. 5-(2-Nitrobenzilideno)tiazolidin-2,4-diona (6e)	38
3.1.3.6. Tentativas de síntese para a 2-(2-nitrobenzilideno)ciclopentan-1,3-diona (6f)	39
3.1.3.7. 2-Nitrobenzilidenos acíclicos 6g-6i	40
3.1.4. 2-Nitrofenilmetilenos derivados de 1,3-dicarbonilos 7	44
3.1.4.1. Síntese da 2,2'-((2-nitrofenil)metileno)bis(ciclopentan-1,3-diona) (7d)	47

3.1.4.2. Tentativas de síntese da 5,5'-((2-nitrofenil)metileno)bis(2,2-dimetil-1,3-dioxan-4,6-diona) (7e)	48
3.1.4.3. Tentativas de síntese da 2,2'-((2-nitrofenil)metileno)bis(5,5-dimetilciclohexan-1,3-diona) (7a)	49
3.1.4.4. Síntese da 5,5'-((2-nitrofenil)metileno)bis(2-tioxodihidropirimidina-4,6(1 <i>H</i> ,5 <i>H</i>)-diona) (7f)	50
3.1.4.5. Síntese da 5,5'-((2-nitrofenil)metileno)bis(1,3-dietil-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1 <i>H</i> ,5 <i>H</i>)-diona) (7g).....	51
3.1.5. <i>N</i> -óxidos de quinolina 8a-c	52
3.1.6. Quinolinas 9	58
3.1.6.1. Síntese de 3,4-dihidroacridin-1(2 <i>H</i>)-ona (9a).....	58
3.2. Avaliação Biológica <i>in vitro</i>	60
3.2.1. Determinação da capacidade inibitória da atividade da XO	60
3.2.2. Determinação dos efeitos na proliferação celular	63
3.3. Estudos <i>in silico</i>	65
3.3.1. <i>Docking</i> molecular	65
3.3.2. Previsão de propriedades farmacocinéticas	67
Capítulo 4 - Conclusões e Perspetivas Futuras	70
Capítulo 5 - Parte Experimental.....	73
5.1. Síntese e caracterização estrutural	74
5.1.1. 5-(2-Nitrobenzilideno)pirimidinas 3a-c	75
5.1.1.1. 1,3-Dimetil-5-(2-nitrobenzilideno)-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1 <i>H</i> ,5 <i>H</i>)-diona (3a)	75
5.1.1.2. 1,3-Dietil-5-(2-nitrobenzilideno)pirimidina-2,4,6(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> ,5 <i>H</i>)-triona (3b)	76
5.1.1.3. 5-(2-Nitrobenzilideno)-1,3-difenilpirimidina-2,4,6(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> ,5 <i>H</i>)-triona (3c).....	76
5.1.2. 5-(Benzisoxazol-3-ilideno)pirimidinas 4a-b	77
5.1.2.1. 5-(Benzo[c]isoxazol-3(1 <i>H</i>)-ilideno)-1,3-dimetil-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1 <i>H</i> ,5 <i>H</i>)- diona (4a)	77
5.1.2.2. 5-(Benzo[c]isoxazol-3(1 <i>H</i>)-ilideno)-1,3-difenilpirimidina-2,4,6(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> ,5 <i>H</i>) -triona (4b)	78
5.1.3. 2-Nitrobenzilidenos derivados de 1,3-dicarbonilos cíclicos 6	78
5.1.3.1. 2-(2'-Nitrobenzilideno) ciclohexan-1,3-diona (6a)	79
5.1.3.2. 2,2-Dimetil-5-(2-nitrobenzilideno) -1,3-dioxan-4,6-diona (6b)	80

5.1.3.3.	2-(2-Nitrobenzilideno)-1 <i>H</i> -inden-1,3(2 <i>H</i>)-diona (6c)	81
5.1.3.4.	(<i>Z</i>)-5-(2-nitrobenzilideno)tiazolidin-2,4-diona (6e)	82
5.1.4.	2-Nitrobenzilidenos derivados de 1,3-dicarbonilos acíclicos 6g-i	82
5.1.4.1.	3-(2-Nitrobenzilideno) pentan-2,4-diona (6g)	83
5.1.4.2.	Dimetil- 2-(2-nitrobenzilideno) malonato (6h)	83
5.1.4.3.	2-(2-Nitrobenzilideno) ácido malónico (6i)	84
5.1.4.4.	(<i>E</i>)-3-(2-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (6j).....	84
5.1.5.	2-Nitrofenilmetilenos derivados de 1,3-dicarbonilos 7	85
5.1.5.1.	(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-1,5-bis(2-nitrofenil)penta-1,4-dien-3-ona (7b).....	85
5.1.5.2.	2,2'-((2-Nitrofenil)metileno)bis(ciclohexan-1,3-diona) (7c)	86
5.1.5.3.	2,2'-((2-Nitrofenil)metileno)bis(ciclopentan-1,3-diona) (7d)	87
5.1.5.4.	5,5'-((2-Nitrofenil) metileno) bis(2-tioxodihidropirimidina-4,6(1 <i>H</i> ,5 <i>H</i>)-diona) (7f)..	88
5.1.5.5.	5,5'-((2-Nitrofenil)metileno)bis(1,3-dietil-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1 <i>H</i> ,5 <i>H</i>)-diona) (7g)	89
5.1.6.	<i>N</i> -óxidos de quinolina 8a-c	89
5.1.6.1.	1-Oxo-1,2,3,4-tetrahydroacridina-10-óxido (8a)	90
5.1.6.2.	3,3-Dimetil-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroacridin-10-óxido (8b)	91
5.1.6.3.	3-Acetil-2-metilquinolin -1-óxido (8c)	91
5.1.6.4.	Estrutura não determinada	92
5.1.7.	Quinolina 9	92
5.1.7.1.	3,4-Dihidroacridin-1(2 <i>H</i>)-ona (9a)	92
5.2.	Avaliação Biológica	93
5.2.1.	Determinação <i>in Vitro</i> da atividade inibitória da Xantina Oxidase	93
5.2.1.1.	Preparação das soluções dos compostos testados	93
5.2.1.2.	Procedimento experimental	93
5.2.2.	Estudos celulares	94
5.2.2.1.	Culturas celulares	94
5.2.2.2.	Preparação das soluções	94
5.2.2.3.	Determinação <i>In Vitro</i> da proliferação celular	95
5.2.3.	Análise Estatística	96
5.3.	Estudos <i>in silico</i>	96

Capítulo 6 - Bibliografia	98
Capítulo 7 - Publicações	107
Capítulo 8 - Anexos	109
5.3.1. Previsão de propriedades farmacocinéticas relevantes e de toxicidade	96
5.3.2. <i>Docking</i> molecular	96
Capítulo 6 - Bibliografia	98
Capítulo 7 - Publicações	107
Capítulo 8 - Anexos	109
Anexo 1 - Ficheiro “AD4_Parameters.dat”	110
Anexo 2 - Comunicação na forma de poster no âmbito desta dissertação	114
Anexo 3 - Comunicação na forma de poster no âmbito desta dissertação	117
Anexo 4 - Artigo Científico em revistas internacionais peer-reviewed referenciadas no Journal Citation Reports (JCR) da ISI Web of Knowledge e/ou SciVerse Scopus	120

Lista de Esquemas

Esquema 1.1 - Reação de hidrólise do MTT com formação do formazano. Adaptado de Terry L Riss <i>et al.</i> ²³	8
Esquema 1.2 - Reações catalisadas pela XO. Adaptado de Tamta <i>et al.</i> ²⁶	9
Esquema 1.3 - Exemplos representativos de fármacos utilizados na clínica que contêm o núcleo de quinolina. Adaptado de Mandewale <i>et al.</i> ⁴¹	11
Esquema 1.4 - Síntese de derivados de quinolinas através da reação de Skraup. Adaptado de Manske <i>et al.</i> ⁴³	12
Esquema 1.5 - Síntese de derivados da quinolina por condensação de <i>o</i> -aminobenzaldeídos e acetaldeídos. Adaptado de Cheng <i>et al.</i> ⁴⁶	12
Esquema 1.6 - Síntese do ácido 2-fenilquinolino-4-carboxílico. Adaptado de Wang <i>et al.</i> ⁴⁸ ..	13
Esquema 1.7 - Figura 1 - Síntese das 2-fenil-4-alcóxiquinolinas. Adaptado de Wang <i>et al.</i> ⁴⁹ .	14
Esquema 1.8 - Síntese de derivados da 2-metil-1,2-di-hidroquinolina, a partir da reação entre a anilina e uma cetona. Adaptado de Hegedüs <i>et al.</i> ⁵⁰	14
Esquema 1.9 - Síntese de quinolinas 2,3,4-trissubstituídas. Adaptado de Zhou <i>et al.</i> ⁵¹ e Ghassamipour <i>et al.</i> ⁵²	15
Esquema 1.10 - Reação de ciclização para a obtenção da quinolina correspondente. Adaptado de Rajawinslin <i>et al.</i> ⁴⁰	15
Esquema 1.11 - Mecanismo possível para a síntese de derivados de quinolina. Adaptado de Rajawinslin <i>et al.</i> ⁴⁰	16
Esquema 1.12 - Síntese de derivados de quinolina a partir do <i>N</i> -óxido de quinolina. Adaptado de Hong Xia <i>et al</i> e FAMILONI <i>et al.</i> ⁵³⁻⁵⁴	17
Esquema 1.13 - Estruturas canônica do <i>N</i> -óxido. Adaptado de Wang <i>et al.</i> ⁶⁰	19
Esquema 1.14 - Síntese de <i>N</i> -óxido de quinolina com potencial antimalárico, a partir da quinolina correspondente. Adaptado de Kesten <i>et al.</i> ⁶¹	20
Esquema 1.15 - Síntese de <i>N</i> -óxido a partir da quinolina correspondente. Adaptado de Jana <i>et al.</i> ⁶²	20

Esquema 1.16 - Formação do N,N'-dióxido de 1,10-fenantrolina. Adaptado de Wang <i>et al.</i> ⁶⁰	20
Esquema 1.17 - Formação de um N-óxido de isoquinolina a partir de uma orto-alcinilbenzaldoxima. Adaptado de Wang <i>et al.</i> ⁶⁰	21
Esquema 1.18 - Formação de um N-óxido de oxazole a partir de uma α -ceto oxima e um benzaldeído. Adaptado de Wang <i>et al.</i> ⁶⁰	21
Esquema 1.19 - Síntese do omeprazol a partir da oxidação da 2,3,5-colidina ao seu derivado N-óxido. Adaptado de Vardanyan <i>et al.</i> ⁶⁴	21
Esquema 3.1 - Síntese das 5-benzilidenopirimidinas 3a-c .	26
Esquema 3.2 - Síntese das 5-(benzisoxazol-3-ilideno)pirimidinas 4a-b .	29
Esquema 3.3 - Síntese da 2-(2'-nitrobenzilideno)ciclohexan-1,3-diona (6a).	32
Esquema 3.4 - Síntese da 2,2-dimetil-5-(2-nitrobenzilideno)-1,3-dioxan-4,6-diona (6b). Condições reacionais: a) H ₂ O/ Δ ; b) MeOH/ peneiros moleculares/ Δ ; c) AlCl ₃ (0,2) / DCM, n-hexano/ t.a.	33
Esquema 3.5 - Síntese da 2-(2-nitrobenzilideno)-1H-inden-1,3(2H)-diona (6c).	35
Esquema 3.6 - Tentativa de síntese da 5,5-dimetil-2-(2-nitrobenzilideno)ciclohexan-1,3-dionea (6d). Condições reacionais: a) H ₂ O/t.a.; b) H ₂ O/t.a.; c) H ₂ O/t.a/80°C; d) KOH (1 eq.)/ EtOH; e) AlCl ₃ (0,2 eq.), DCM, n-hexano/ t.a; f) trietilamina (Et ₃ N)/ AlCl ₃ (0,2 eq.)/ DCM/ n-hexano/ t.a; g) piperidina (0,1 eq.)/ CH ₃ COOH (0,2 eq.)/ benzeno; h) metóxido de sódio/ t.a.	36
Esquema 3.7 - Tentativa de síntese de 5,5-dimetil-2-(2-nitrobenzilideno)ciclohexan-1,3-diona (6d).	38
Esquema 3.8 - Síntese da 5-(2-nitrobenzilideno) tiazolidin-2,4-diona (6e).	38
Esquema 3.9 - Tentativas de síntese para a 2-(2-nitrobenzilideno)ciclopentan-1,3-diona (6f). Condições reacionais: a) H ₂ O/t.a./ Δ ; b) AlCl ₃ /DCM/n-hexano/t.a.	39
Esquema 3.10 - Síntese dos 2-nitrobenzilidenos acíclicos 6g-6i .	40
Esquema 3.11 - Síntese da (E)-3-(2-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (6j).	42
Esquema 3.12 - Tentativa de síntese da (E)-4-(2-nitrofenil)but-3-en-2-ona (6k), com obtenção de 7b .	43

Esquema 3.13 - Síntese da 2,2'-((2-nitrofenil)metileno)bis(ciclohexan-1,3-diona) (7c). Condições reacionais: a) H ₂ O/ Δ ; b) H ₂ O/t.a.; c) MeOH/ Δ ; d) MeOH, peneiros moleculares (PM)/t.a.; e) MeOH, PM/ Δ ; f) éter etílico seco, PM/ t.a.; g) éter etílico seco, PM/HCl 5%/ t.a.; h) éter etílico seco, PM/Et ₃ N/ t.a.; i) prolina/t.a.; j) BiCl ₃ / Δ ; k) AlCl ₃ /MeOH, PM/ Δ ; l) AlCl ₃ /MeOH, PM/ Δ ; m) AlCl ₃ /EtOAc seco/t.a.; n) AlCl ₃ /tolueno/t.a.; o) AlCl ₃ /tolueno/ Δ ; p) EtOH/ Δ ; q) CH ₃ COOH/ Δ ; r) benzeno seco/ Δ ; s) fusão.	44
Esquema 3.14 - Síntese da 2,2'-((2-nitrofenil)metileno)bis(ciclopentan-1,3-diona) (7d). Condições reacionais: a) H ₂ O/t.a.; b) H ₂ O/t.a./ Δ ;).	47
Esquema 3.15 - Tentativas de síntese da 5,5'-((2-nitrofenil)metileno)bis(2,2-dimetil-1,3-dioxan-4,6-diona 7e). Condições reacionais: a) H ₂ O/ Δ ; b) EtOH/ Δ ; c) MeOH/ Δ	48
Esquema 3.16 - Tentativas de síntese da 2,2'-((2-nitrofenil)metileno)bis(5,5-dimetilciclohexan-1,3-diona) (7a); Condições reacionais: a) KOH/EtOH/H ₂ O/ Δ ; b) H ₂ O; c) CH ₃ COOH.	49
Esquema 3.17 - Síntese da 5,5'-((2-nitrofenil)metileno)bis(2-tioxohidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona 7f). Condições reacionais: a) H ₂ O/t.a.; b) H ₂ O/ Δ ; c) EtOH/ Δ	50
Esquema 3.18 - Síntese 5,5'-((2-nitrofenil)metileno)bis(1,3-dietil-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona) (7g).	52
Esquema 3.19 - Síntese de 8 a partir de 2-nitrobenzilidenos 6 e 2-nitrofenilmetilenos 7	54
Esquema 3.20 - Mecanismo reacional do N-óxido de quinolina 8a a partir do derivado 2-nitrobenzilideno cíclico 6a	57
Esquema 3.21 - Mecanismo reacional do N-óxido de quinolina 8a a partir do derivado 2-nitrofenilmetileno 7c	57
Esquema 3.22 - Síntese da quinolina 9a e do respetivo N-óxido 8a	58

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Fases da descoberta de novos fármacos. Adaptado de Lombardino <i>et al.</i> ¹	4
Figura 1.2 - Enquadramento do CADD no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos. Adaptado de Sliwoski <i>et al.</i> ¹⁰	5
Figura 1.3 - Processo de docking molecular. Adaptado de Morris, <i>et al.</i> ¹²	6
Figura 1.4 - Resumo do processo de docking molecular. Adaptado de Ruyck <i>et al.</i> ¹³	6
Figura 1.5 - Exemplos de inibidores da XO, adaptado de Kumar e Matsumoto <i>et al.</i> ³⁵⁻³⁶	10
Figura 1.6 - Estruturas químicas da quinina e cinchonina. Adaptado de Olsen e Igarashi <i>et al.</i> ⁴⁴⁻⁴⁵	12
Figura 1.7 - Algumas aplicações dos derivados de quinolina. Adaptado de Rajawinslin <i>et al.</i> ⁴⁰	16
Figura 1.8 - Estrutura química do minoxidilo. Adaptado de Mfuh <i>et al.</i> ⁵⁵	17
Figura 1.9 - Estrutura química do ancriviroc, e do otamixaban. Adaptado de Lariovon <i>et al.</i> e de Mfuh <i>et al.</i> ^{55, 58}	18
Figura 3.1 - Interações entre o ligando original (Y-700), alopurinol, 3c e 7g e a XO. Verde - pontes de hidrogénio; verde claro - interações de van der Waals; roxo - interações Pi-Sigma; amarelo - interações Pi-enxofre; rosa - interações Pi-Pi e rosa claro - interações Pi - alquilo. ...	66

Lista de Gráficos

- Gráfico 3.1** - Curva de calibração para o ácido úrico a 295 nm, com a respetiva equação da reta e o seu r^2 60
- Gráfico 3.2** - Percentagem de inibição da atividade da XO por parte dos compostos **3a-c**, **4a-b**, **6a-c**, **6e**, **6g-6j**, **7b**, **7c**, **7d**, **7f**, **7g**, **8a-c** e **9a** e alopurinol, utilizado como controlo positivo, a uma concentração de 30 μ M e após 5 minutos de incubação. Os dados são apresentados com os respetivos erros padrão (SEM - do inglês standard error of the mean) e são representativos das duas experiências independentes realizadas. * $p < 0.05$ em relação ao controlo (Teste- t de Student). 61
- Gráfico 3.3** - Percentagem de inibição da atividade enzimática da XO em função do tempo, para os compostos **3a-c**, **6a-c**, **7g** e alopurinol a uma concentração de 30 μ M. 62
- Gráfico 3.4** - Percentagem relativa de proliferação celular em células NHDF e MCF-7 após 72 horas de exposição aos compostos 5-FU, **3a-c**, **4a-b**, **6a-c**, **6e**, **6g-j**, **7b**, **7c**, **7d**, **7f**, **7g**, **8a-c** e **9a** a uma concentração de 30 μ M. Os dados são apresentados com os respetivos erros padrão (SEM - do inglês standard error of the mean), e são representativos das duas experiências independentes realizadas (NHDF) e única experiência representativa (MCF-7). * $p < 0.05$ em relação ao controlo (Teste- t de student). 63

Lista de Tabelas

Tabela 3.1 - Bandas caraterísticas dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para os compostos 3a-c	27
Tabela 3.2 - RMN de ^1H das 5-(2-Nitrobenzilideno)pirimidinas 3a-c , em $\text{DMSO-}d_6$	28
Tabela 3.3 - RMN de ^{13}C das 5-(2-Nitrobenzilideno)pirimidinas 3a-c , em $\text{DMSO-}d_6$	28
Tabela 3.4 - Bandas caraterísticas dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para os compostos 4a-b	29
Tabela 3.5 - RMN de ^1H das 5-(benzisoxazol-3-ilideno)pirimidinas 4a-b , em $\text{DMSO-}d_6$	31
Tabela 3.6 - RMN de ^{13}C das 5-(benzisoxazol-3-ilideno)pirimidinas 4a-b , em $\text{DMSO-}d_6$	31
Tabela 3.7 - Bandas caraterísticas dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para 6a	33
Tabela 3.8 - Condições reacionais: a) $\text{H}_2\text{O}/\Delta$; b) $\text{MeOH}/$ peneiros moleculares/ Δ ; c) AlCl_3 (0,2 eq.)/ DCM , n -hexano/ t.a. e rendimentos obtidos para a síntese de 2,2-dimetil-5-(2-nitrobenzilideno) -1,3-dioxan-4,6-diona (6b).	34
Tabela 3.9 - Bandas caraterísticas dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para o composto 6b	34
Tabela 3.10 - RMN de ^1H da 2-(2'-nitrobenzilideno)ciclohexan-1,3-diona (6a) e da 2,2-dimetil-5-(2-nitrobenzilideno) -1,3-dioxan-4,6-diona (6b), em $\text{DMSO-}d_6$	35
Tabela 3.11 - RMN de ^{13}C da 2-(2'-nitrobenzilideno)ciclohexan-1,3-diona (6a) e da 2,2-dimetil-5-(2-nitrobenzilideno) -1,3-dioxan-4,6-diona (6b), em $\text{DMSO-}d_6$	35
Tabela 3.12 - Bandas caraterísticas dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para a 2-(2nitrobenzilideno)-1 <i>H</i> -inden-1,3(2 <i>H</i>)-diona (6c).	36
Tabela 3.13 - Tentativa de síntese de 5,5-dimetil-2-(2-nitrobenzilideno)ciclohexan-1,3-diona (6d). Condições reacionais: a) $\text{H}_2\text{O}/\text{t.a.}$; b) $\text{H}_2\text{O}/\text{t.a.}$; c) $\text{H}_2\text{O}/\text{t.a.}/80\text{ }^\circ\text{C}$; d) KOH (1 eq.)/ EtOH ; e) AlCl_3 (0,2 eq.), DCM , n -hexano/ t.a; f) trietilamina (Et_3N)/ AlCl_3 (0,2 eq.)/ DCM/ n -hexano/ t.a; g) piperidina (0,1 eq.)/ CH_3COOH (0,2 eq.)/ benzeno; h) metóxido de sódio/ t.a.	37
Tabela 3.14 - Bandas caraterísticas dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para a 5-(2-nitrobenzilideno)tiazolidin-2,4-diona (6e).	39

Tabela 3.15 - Tentativas de síntese para a 2-(2-nitrobenzilideno)ciclopentan-1,3-diona (6f). Condições reacionais: a) H ₂ O/t.a./Δ; b) AlCl ₃ /DCM/ <i>n</i> -hexano/t.a.	39
Tabela 3.16 - Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para os 6g-6i	40
Tabela 3.17 - RMN de ¹ H dos compostos 6g e 6h (DMSO- <i>d</i> ₆) e 6i (CDCl ₃ - <i>d</i>).	41
Tabela 3.18 - Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para os 6j	42
Tabela 3.19 - Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para 7b	43
Tabela 3.20 - Síntese da 2,2'-((2-nitrofenil)metileno)bis(ciclohexan-1,3-diona) (7c). Condições reacionais: a) H ₂ O/Δ; b) H ₂ O/t.a.; c) MeOH/Δ; d) MeOH, peneiros moleculares (PM)/t.a.; e) MeOH, PM/Δ; f) éter etílico seco, PM/ t.a.; g) éter etílico seco, PM/HCl 5%/ t.a.; h) éter etílico seco, PM/Et ₃ N/ t.a.; i) prolina/t.a.; j) BiCl ₃ /Δ; k) AlCl ₃ /MeOH, PM/Δ; l) AlCl ₃ /MeOH, PM/Δ; m) AlCl ₃ /EtOAc seco/t.a.; n) AlCl ₃ /tolueno/t.a.; o) AlCl ₃ /tolueno/Δ; p) EtOH/Δ; q) CH ₃ COOH/Δ; r) benzeno seco/Δ; s) fusão.	45
Tabela 3.21 - Síntese da 2,2'-((2-nitrofenil)metileno)bis(ciclopentan-1,3-diona) (7d). Condições reacionais: a) H ₂ O/t.a.; b) H ₂ O/t.a./Δ;).	47
Tabela 3.22 - Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para 7d	48
Tabela 3.23 - Tentativas de síntese da 5,5'-((2nitrofenil)metileno)bis(2,2-dimetil-1,3-dioxan-4,6-diona) (7e). Condições reacionais: a) H ₂ O/Δ; b) EtOH/Δ; c) MeOH/Δ e respectivos tempos reacionais.	49
Tabela 3.24 - Tentativas de síntese da 2,2'-((2-nitrofenil)metileno)bis(5,5-dimetilciclohexan-1,3-diona) (7a); Condições reacionais: a) KOH/EtOH/H ₂ O/Δ; b) H ₂ O; c) CH ₃ COOH; e respectivo tempo reacional.	50
Tabela 3. 25 - Síntese de 5,5'-((2-nitrofenil)metileno)bis(2-tioxohidropirimidina-4,6(1 <i>H</i> ,5 <i>H</i>)-diona) (7f). Condições reacionais: a) H ₂ O/t.a.; b) H ₂ O/Δ; c) EtOH/Δ.	51
Tabela 3.26 - Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para 7f	51
Tabela 3.27 - Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para 7g	52

Tabela 3.28 - Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para os compostos 8a , 8b e 8c	55
Tabela 3.29 - RMN de ^1H dos compostos 8a-c , em $\text{DMSO}-d_6$	56
Tabela 3.30 - RMN de ^{13}C dos compostos 8a-c , em $\text{DMSO}-d_6$	56
Tabela 3.31 - Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para o composto 9a	58
Tabela 3.32 - Valores de IC_{50} estimados por ajuste sigmoidal para a inibição da atividade da XO dos compostos alopurinol, 3a-c , 6a-c e 7g	62
Tabela 3. 33 - Valores de IC_{50} estimados por ajuste sigmoidal para a inibição da atividade anti proliferativa nas células NHDF dos compostos 5-FU , 6g , 6h , 6j e 6k	64
Tabela 3.34 - Energias de ligação e interações por pontes de hidrogénio dos compostos Y-700, alopurinol, 3a , 3b , 3c , 6a , 6b , 6c e 7g , no sítio ativo da XO.	66
Tabela 3.35 - Dados computacionais para os descritores das regras de Lipinski e parâmetros de Veber, calculados através do software pkSCM <i>on-line</i> para 3a , 3b , 3c , 6a , 6b , 6c , 6j e 7g . .	67
Tabela 3.36 -Dados computacionais calculados para as propriedades ADMET com base nos modelos do software pkSCM <i>on-line</i> para os compostos 3a , 3b , 3c , 6a , 6b , 6c , 6j e 7g	69

Lista de Acrônimos, abreviaturas e símbolos

AB	Antibiótico/antimicótico
AcOEt	Acetato de etilo
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Ar	Aromático - do inglês, aromatic
ATR	Refletância total atenuada - do inglês, <i>Attenuated Total Reflectance</i>
BHE	Barreira Hematoencefálica
CADD	Desenho de fármacos assistido por computador - do inglês, <i>computer-aided drug design</i>)
ccf	Cromatografia em camada fina
CDCl ₃ -d	Clorofórmio deuterado
DCM	Diclorometano
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
d	Duplete
dd	Duplo duplete
ddd	Duplo duplo duplete
dddd	Duplo duplo duplo duplete
dec.	Decomposição
DEPT	Intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização - do inglês, <i>Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer</i>
dt	Duplo tripleto
DMF	N,N-dimetilformamida
DPA	Ácido dodecilsulfônico
EAN	Nitrato de amônio etílico
EMA	Agência Europeia do Medicamento - do inglês, <i>European Medicines Agency</i>
EtOH	Etanol
FBS	Soro fetal bovino - do inglês, <i>Fetal Bovine Serum</i>
FDA	Administração Federal de Alimentos e Medicamentos - do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Infravermelho por transformada de Fourier - do inglês, <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
GLU	Glutamina

HMBC	Correlação heteronuclear a múltiplas ligações - do inglês, <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	Correlação heteronuclear a uma ligação - do inglês, <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HTS	Screening de alto rendimento - do inglês, <i>High-throughput screening</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória para metade da atividade máxima - do inglês, <i>half maximal inhibitory concentration</i>
Lit.	Literatura
log P	Logaritmo do coeficiente de partilha
m	Multiplete
MCF-7	Células epiteliais humanas de adenocarcinoma da mama - do inglês <i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
MCPBA	Ácido <i>m</i> -cloroperoxibenzóico
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NHDF	Fibroblastos normais da derme humana - do inglês <i>Normal Human Dermal Fibroblasts</i>
PDB	Base de dados de proteínas - do inglês, <i>Protein Data Bank</i>
pf	Ponto de fusão
PM	Peneiros moleculares
QSAR	Relação estrutura-atividade quantitativa - do inglês, <i>Quantitative Structure-Activity Relationships</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de protão
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMSD	Desvio da raíz quadrada média, do inglês - <i>Root Mean Square Deviation</i>
RPMI	Do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
ROS	Espécies reativas de oxigénio - do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
s	Singuleto
SAR	Relação estrutura atividade - do inglês, <i>Structure-Activity Relationship</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
s	Singuleto
t	Tripleto
t.a.	Temperatura ambiente
td	Triplo duplete
THF	Tetrahidrofurano
THR	Treonina
XO	Xantina oxidase
δ	Desvio(s) químico(s) em RMN (ppm)
η	Rendimento (%)
ν _{máx}	Frequência máxima da banda de absorção (cm ⁻¹)

QSAR	Relação estrutura-atividade quantitativa - do inglês, <i>quantitative structure activity relationships</i>
5-FU	5-Fluorouracilo

Capítulo 1 - Introdução

Com este capítulo pretende-se efetuar uma breve introdução à química medicinal e ao desenvolvimento de fármacos, dando posteriormente ênfase à importância das quinolinas e em especial aos seus derivados *N*-óxidos.

Na secção 1.1 será apresentada uma breve perspetiva da química medicinal no desenvolvimento de fármacos, bem como ferramentas *in silico* e *in vitro* que auxiliam a este desenvolvimento. Dentro das ferramentas computacionais, são abordadas de um modo ligeiro o *docking* molecular e a predição de propriedades farmacocinéticas de absorção, distribuição, metabolismo e excreção e toxicidade (ADMET) de moléculas candidatas a fármacos. Relativamente aos ensaios *in vitro*, apresentados posteriormente na subsecção 1.1.2, serão destacados ensaios de viabilidade celular e também o estudo da avaliação da inibição da atividade da xantina oxidase (XO), tendo em conta os objetivos para esta dissertação de mestrado.

Na secção 1.2, será apresentada uma breve história das quinolinas bem como dos seus derivados, em especial os derivados *N*-óxidos, com especial atenção para as diferentes abordagens envolvidas na sua síntese, assim como as suas principais aplicações farmacológicas.

1.1. A Química Medicinal e o desenvolvimento de fármacos

Atualmente, os químicos medicinais têm um papel preponderante na descoberta e desenvolvimento de fármacos.¹ Nas décadas passadas, embora os compostos bioativos não estivessem identificados, os produtos naturais estavam associados à medicina tradicional. Na tentativa de encontrar um tratamento para uma determinada doença, o Homem experimentava diversos produtos naturais. Através das consequências causadas pelos mesmos, começou-se por ter conhecimento acerca de produtos naturais, principalmente de plantas medicinais. Diversas experiências relacionadas com a medicina tradicional conduziram a uma grande parte dos medicamentos tradicionais, os quais foram posteriormente sujeitos a estudos químicos, farmacológicos e clínicos. Como exemplo representativo, destaca-se a morfina, extraída a partir do ópio da papoila.² Partindo dos compostos de origem vegetal ocorreu o desenvolvimento e refinamento de substâncias, o que teve um grande impacto ao nível da química medicinal. O aparecimento da química analítica, no final do século XIX, facilitou o isolamento e caracterização de compostos bioativos a partir de plantas medicinais, embora os graus de pureza em termos de princípios ativos isolados, fossem ainda reduzidos. No século XX, o conhecimento químico sofreu novos avanços, designadamente, com base no conceito da aromaticidade do benzeno proposto por August Kekulé. Tal conceito influenciou a teoria dos “quimiorreceptores”, postulada originalmente por Paul Ehrlich.³⁻⁴ Ao longo do século XX, a investigação no desenvolvimento de fármacos foi enriquecida pelas novas tecnologias e pela revolução da bioquímica e da biologia molecular, que foram relevantes na descoberta de novos alvos biológicos.⁴

Assim sendo, a química medicinal pode ser dividida em duas épocas diferentes. Uma época na qual a química medicinal se baseava em ensaios *in vivo*, onde o papel do químico medicinal era fulcral para o sucesso, uma vez que existia um número limitado de composto sintetizados, onde o serendipismo desempenhava um papel importante. A outra época, surge mais recentemente com aparecimento de novas tecnologias de *screening* as quais permitiram um melhoramento no desenvolvimento de fármacos.^{1, 3-4}

Desta forma, a química medicinal demonstra-se com sendo uma área complexa que compreende várias disciplinas, nomeadamente a biologia, a bioquímica, a farmacologia, a matemática, a computação e a modelação molecular.³

O desenvolvimento de fármacos é um processo longo, complexo e dispendioso. Atualmente, o objetivo deste desenvolvimento continua a ser o mesmo de há alguns anos: procurar e potenciar moléculas mais seguras, farmacologicamente mais potentes e direcionadas para um determinado alvo. Mesmo com a evolução da química medicinal e de todas as ferramentas que esta utiliza, são ainda despendidos, em média, entre 12 e 24 anos desde o início do projeto até ao lançamento do fármaco no mercado, para a maioria dos medicamentos disponíveis comercialmente. Apesar de inicialmente estarem envolvidas milhares de moléculas, após os ensaios de segurança e eficácia, aproximadamente um, de quinze a vinte cinco candidatos a fármacos, pode tornar-se comercializado. De entre os candidatos a fármacos que continuam sujeitos a estudos e que chegam ao mercado, apenas um em cada três se tornará importante para a clínica. Apesar de ser um processo muito dispendioso, os benefícios que poderão ser proporcionados aos pacientes e às indústrias farmacêuticas do ponto de vista económico continuam a ser uma motivação para todos os envolvidos.¹

Todo este processo é iniciado com a identificação de uma necessidade clínica, incluindo uma revisão sobre as terapias existentes. Com base nessa análise, são formulados pressupostos por forma a melhorar a terapêutica.⁵ Neste contexto, o desenvolvimento computacional, nomeadamente o *docking* molecular e o *screening* virtual de alto rendimento (vHTS - do inglês, *virtual high-throughput screening*), conjuntamente com a química combinatória e o *screening* de alto rendimento (HTS - do inglês, *high-throughput screening*) permitem avaliar diversos compostos num curto espaço de tempo.⁶ Seguidamente, os dados de *screening* prosseguem para estudos de relação estrutura-atividade (SAR - do inglês, *structure-activity relationship*), levando à identificação de *hits*.^{1, 6} Por outro lado, a previsão *in silico* de propriedades ADMET e das relações quantitativas de estrutura-atividade (QSAR - do inglês, *Quantitative Structure-Activity Relationship*) também são ferramentas cruciais para a eficácia e sucesso do processo de descoberta.⁷

Após a realização dos ensaios *in vitro*, na maioria dos casos, é necessário encontrar um modelo *in vivo* capaz de reproduzir as circunstâncias associadas a patologia em estudo.¹ Nesta fase, são selecionadas moléculas *lead*, as quais poderão ser otimizadas com recurso a diversas alterações estruturais a fim de melhorar as propriedades farmacológicas desejadas. Neste ponto de

otimização, são novamente fundamentais as técnicas *in silico* e *in vitro* supracitadas e a consideração do perfil ADMET de cada molécula.⁸ Se o composto em estudo for eficaz e seguro em todos os ensaios pré-clínicos realizados, todo o processo de estudo passa às agências reguladoras do medicamento, como é o caso da Agência Europeia do Medicamento (EMA - do inglês, *European Medicines Agency*) e da *Food and Drug Administration* (FDA), antes de qualquer ensaio clínico (figura 1.1).^{1, 8} Os ensaios clínicos abrangem quatro fases, sendo estas realizadas de forma sequencial:

- Fase I - avalia-se a tolerância ao fármaco em voluntários saudáveis e recolhem-se dados farmacocinéticos;
- Fase II - realizam-se ensaios de eficácia e intervalos de doses em voluntários doentes;
- Fase III - efetuam-se ensaios generalizados em milhares de pacientes, para se desenvolver uma ampla base de dados sobre a eficácia e segurança do fármaco;
- Fase IV - realizam-se estudos após a comercialização do fármaco.^{1, 8}

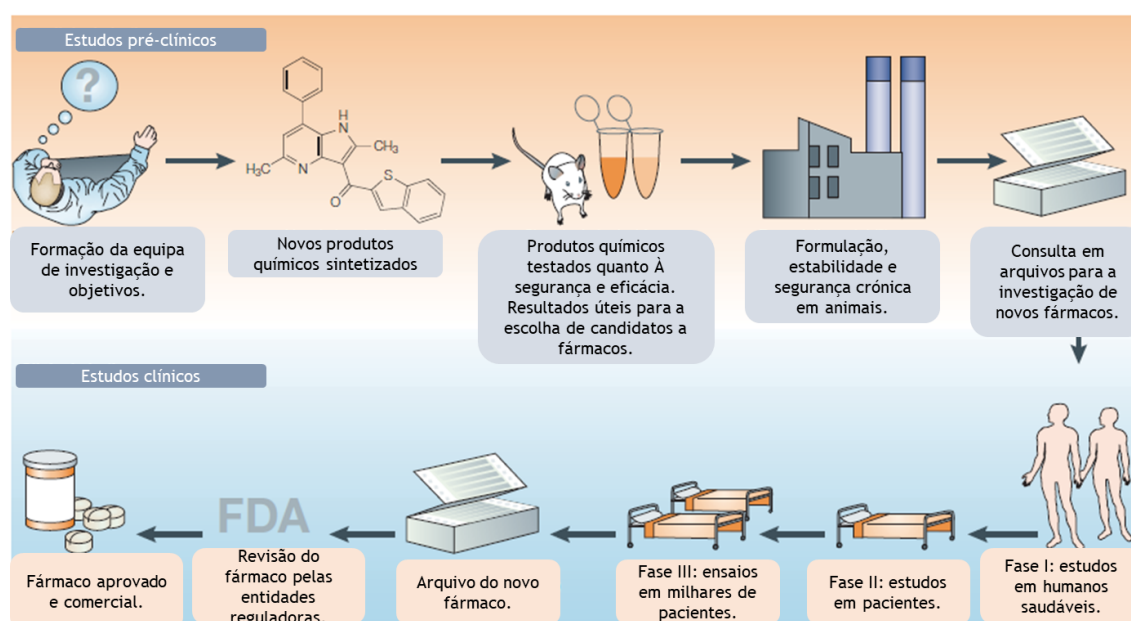


Figura 1.1 - Fases da descoberta de novos fármacos. Adaptado de Lombardino *et al.*¹

1.1.1. Estudos *in silico* - *docking* molecular e predição de propriedades ADMET

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é muito complexo e demorado sendo necessário um esforço interdisciplinar para projetar fármacos eficazes e comercialmente viáveis. O aumento da disponibilidade de informação sobre macromoléculas biológicas e pequenas moléculas têm impulsionado o uso de ferramentas computacionais neste processo de desenvolvimento.⁹

Neste contexto, o desenho de fármacos assistido por computador (CADD - do inglês, *computer-aided drug design*) tem sido uma estratégia cada vez mais utilizada pela indústria farmacêutica,

de maneira a economizar e minimizar o tempo no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos (figura 1.2).¹⁰⁻¹¹

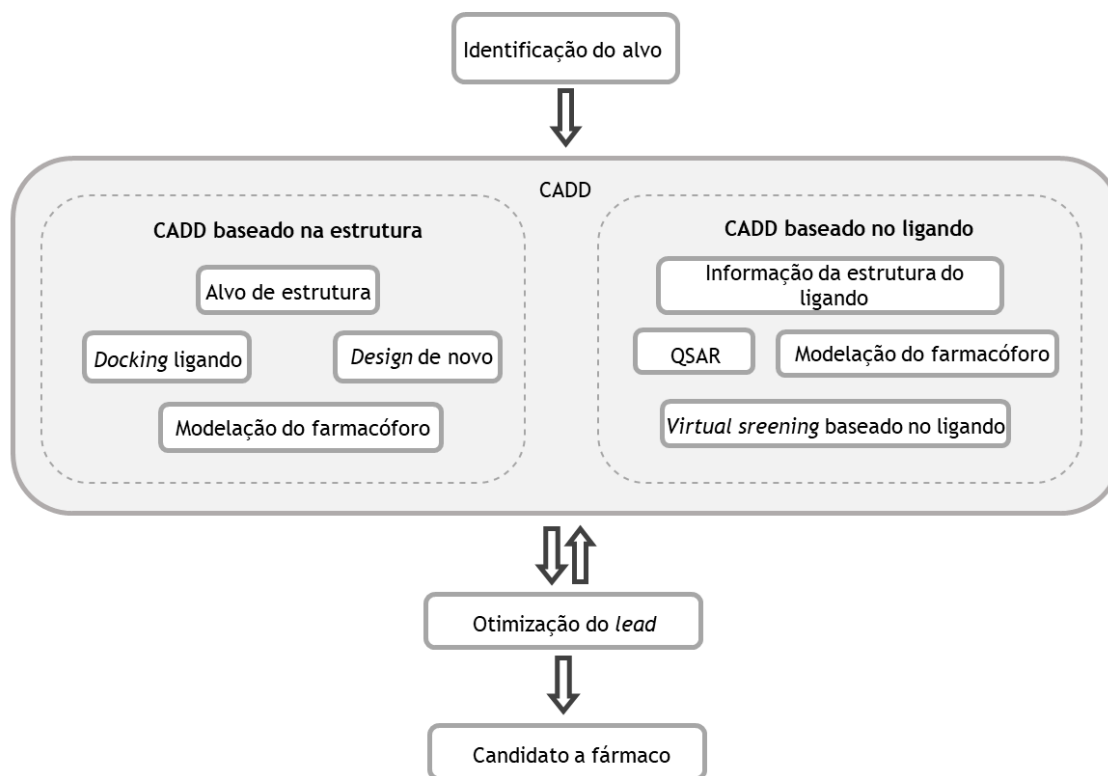


Figura 1.2 - Enquadramento do CADD no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos. Adaptado de Sliwoski *et al.*¹⁰

Dentro das ferramentas de CADD, encontra-se o *screening* virtual utilizando o *docking* molecular, obtendo-se assim informação relevante para o planeamento racional de fármacos. Através do *docking* molecular, consegue-se prever o reconhecimento molecular, tanto estruturalmente, como do ponto de vista energético. Neste contexto, prevê-se a afinidade de ligação entre pequenas moléculas (ligando) e o alvo (geralmente é proteico, por exemplo, uma enzima) de forma a retirar ilações acerca da sua ativação ou inibição. Desta forma, o alvo e o ligando são seleccionados, preparados conforme o *software* utilizado e após a realização do *docking* os resultados são analisados (figura 1.3).¹²

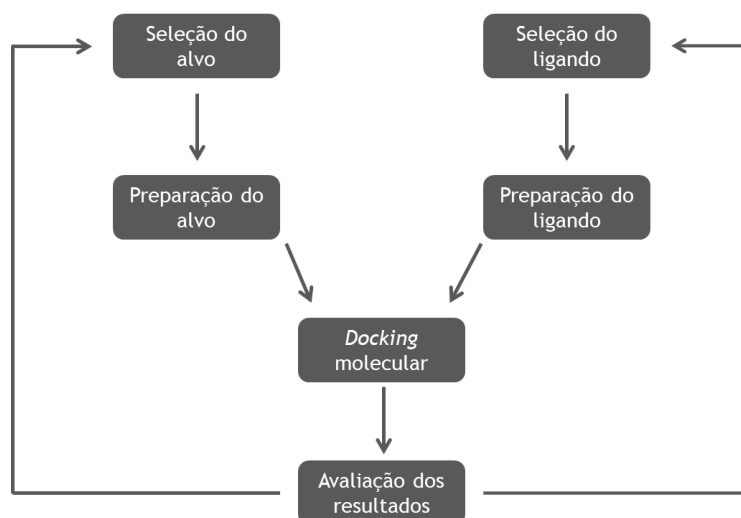


Figura 1.3 - Processo de docking molecular. Adaptado de Morris, *et al.*¹²

O *docking* pode basear-se na estrutura do alvo biológico pretendido ou utilizar estruturas homólogas a esta quando a estrutura desejada não se encontra descrita. Assim, estas estruturas são submetidas a um processo de *docking* para um *screening* virtual inicial. Posteriormente, analisam-se os resultados e quando estes não são especialmente favoráveis, as estruturas podem ser sujeitas a modificações estruturais de forma a obter uma melhor interação entre o ligando e o alvo. Concluído o estudo, diversas moléculas poderão ser promissoras e, portanto, potenciais candidatas a fármacos (figura 1.4).¹³

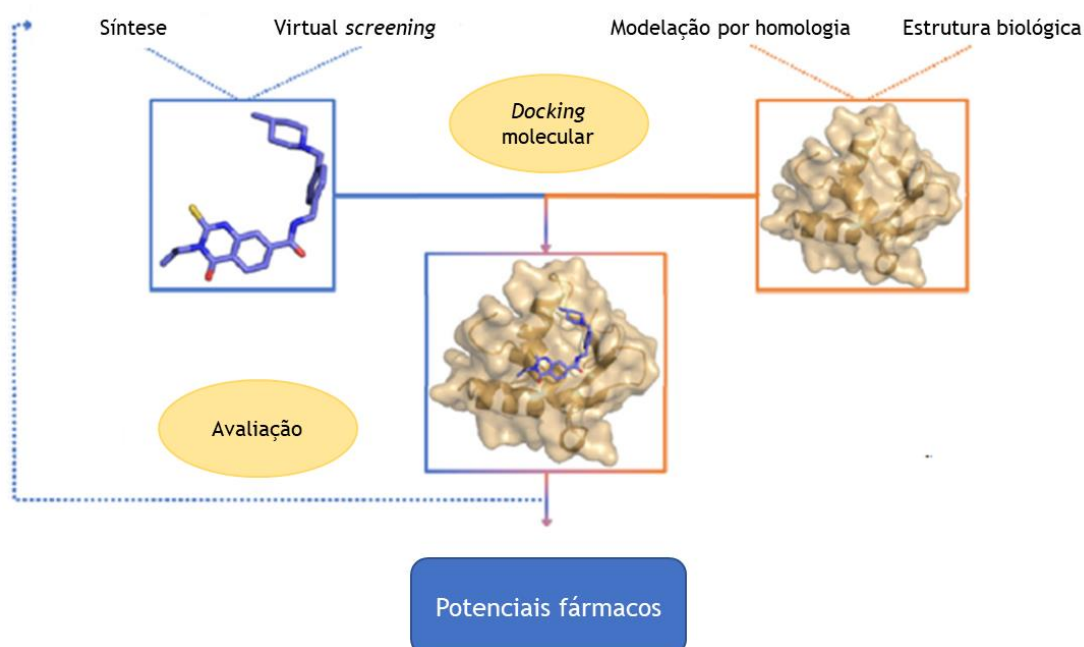


Figura 1.4 - Resumo do processo de *docking* molecular. Adaptado de Ruyck *et al.*¹³

De entre as várias aplicações do *docking* molecular, podem destacar-se como principais, a identificação de *hits*, a otimização de *leads*, e a análise da interação entre essas moléculas com o ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas e/ou enzimas.¹⁴ Os *softwares* computacionais mais utilizados para a realização do *docking* molecular são o Gold, o Glide e o AutoDock, sendo que os dois primeiros são *softwares* comerciais, enquanto o último se encontra disponível gratuitamente.¹³

Um programa bem-sucedido de descoberta e desenvolvimento de fármacos, para além de requerer um alvo terapêutico adequado para uma necessidade clínica, requer também um conjunto de metodologias necessárias capaz de preverem com precisão, não só a eficácia, mas também o comportamento farmacocinético e de toxicidade de novas entidades químicas.¹⁵ Assim, para além das propriedades farmacodinâmicas (como potência, afinidade, eficácia e seletividade), também um rastreio de alto rendimento das propriedades ADMET são cruciais no processo de desenvolvimento de novos fármacos, pretendendo-se aumentar a taxa de sucesso de candidatos a fármacos quando administrados em animais ou humanos, permitindo uma redução do número de compostos que falham na fase clínica.^{7, 15} Desta forma, *softwares* de previsão de propriedades ADMET têm-se revelado uma ferramenta importante no desenvolvimento de novos fármacos, prevendo propriedades ADMET de compostos a partir da sua estrutura química, nomeadamente utilizando modelos de QSAR 2D e 3D, pesquisa de similaridade e também modelação do farmacóforo.^{7, 16}

Um exemplo dessas abordagens é a plataforma pkCSM, que permite a análise e otimização das propriedades ADMET numa interface *web* disponível de forma gratuita. Este método baseia-se em assinaturas de gráficos de distância que são suportadas por um conceito, o *Cutoff Scanning*, que representa a estrutura e a química de uma molécula pequena. Assim, estão envolvidos trinta preditores que estão divididos em cinco classes principais: absorção (sete preditores), distribuição (quatro preditores), metabolismo (sete preditores), excreção (dois preditores) e toxicidade (dez preditores). Além do perfil ADMET, este *software* também é capaz de prever a “Regra dos 5” de Lipinski.⁷ Estas regras ajudam a prever a biodisponibilidade oral, tendo-se considerado que um bom candidato a fármaco pode ter, no máximo, uma violação dos seus requisitos.¹⁷ Desta forma, segundo as Regras de Lipinski, um bom candidato a fármaco deve conter os seguintes requisitos:

- Massa molecular ≤ 500 Da;
- $\log P \leq 5$;
- Dadores de pontes de hidrogénio ≤ 5 ;
- Aceitadores de pontes de hidrogénio ≤ 10 .¹⁸⁻¹⁹

Posteriormente, surgiram os parâmetros de Veber que, em conjunto com as Regras de Lipinski, permitem também auxiliar a previsão da biodisponibilidade oral. Para que um candidato se torne um bom candidato a fármaco, segundo Veber, tem que respeitar os seguintes critérios:

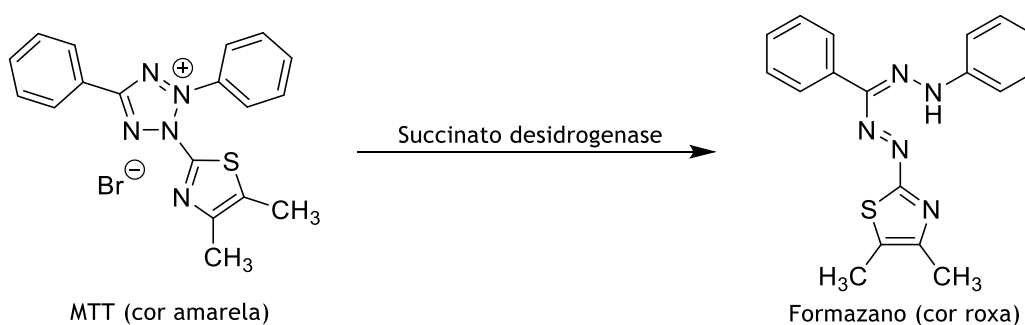
- Ligações rotáveis ≤ 10 ;

- Área de superfície polar $\leq 140 \text{ \AA}^2$ (ou 12 ou menos aceptores e doadores de pontes de hidrogénio).²⁰

1.1.2. Ensaios *in vitro* - Estudos de proliferação celular e inibição da atividade da XO

Assim como os ensaios *in silico*, também os ensaios *in vitro* constituem uma ferramenta essencial para o sucesso na descoberta de novos candidatos a fármacos. Estes ensaios realizam-se numa fase inicial da descoberta de fármacos, de modo a eliminar as moléculas que não sejam promissoras. Estas ferramentas têm a vantagem de permitir uma avaliação biológica rápida, simples e rentável, sendo cruciais para o desenvolvimento de fármacos.²¹ Através destes ensaios é possível analisar a atividade dos compostos sobre diferentes características, como a indução de morte e proliferação celular, mudanças na expressão génica, alterações no perfil proteico, mudanças na avaliação do ciclo celular, potencial de resistência a outros fármacos, entre outras.²²

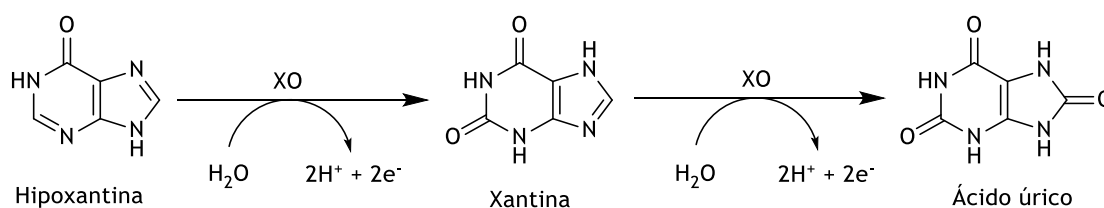
De modo a determinar a proliferação celular utiliza-se o ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este foi o primeiro ensaio de viabilidade celular homogêneo desenvolvido para uma placa com 96 poços, sendo adequado para HTS.²³ Neste método, o MTT é reduzido pelas enzimas succinato desidrogenases que se encontram presente nas células viáveis, havendo clivagem do seu anel central. Inicialmente, o composto é um sal tetrazólico solúvel em água e que tem uma coloração amarela, e após a sua clivagem forma-se um composto insolúvel roxo (cristais de formazano) (esquema 1.1). Devido a esta alteração da coloração pode-se quantificar a formação dos cristais através de uma leitura espectrofotométrica a 570 nm, tendo-se considerado que a concentração deste composto está diretamente relacionada com a viabilidade celular.²³⁻²⁴



Esquema 1.1 - Reação de hidrólise do MTT com formação do formazano. Adaptado de Terry L Riss *et al.*²³

Desta forma, as células viáveis têm a capacidade de converterem o MTT em cristais de formazano, em contraste com as células não viáveis. Este ensaio, devido a todas as suas vantagens, tem sido amplamente adotado por muitos laboratórios.²⁴

Em contraste com os ensaios baseados em células, os ensaios bioquímicos são aplicados num alvo concreto, como uma enzima.⁵ Neste contexto, a XO é um alvo biológico validado na terapia da gota, sendo a sua inibição seletiva uma estratégia promissora no controlo desta condição patológica e de outras.²⁵ Esta enzima foi descoberta por Schardinger no ano de 1902, sendo reconhecida também por “enzima de Schardinger” e é uma importante e complexa molibdoflavoproteína responsável pela conversão de hipoxantina em xantina e xantina em ácido úrico (esquema 1.2).²⁶ Esta conversão implica também a redução do oxigénio e, por consequência, a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS - do inglês *Reactive oxygen species*), nomeadamente o radical anião superóxido e o peróxido de hidrogénio.²⁷⁻²⁸



Esquema 1.2 - Reações catalisadas pela XO. Adaptado de Tamta *et al.*²⁶

As ROS são produzidas por vários sistemas, incluindo pela NADPH oxidase, por enzimas respiratórias mitocondriais e pela XO, as quais podem desencadear vários fenómenos fisiológicos e patológicos.²⁹ Estas espécies são responsáveis por danos estruturais em tecidos e também podem comprometer a sinalização celular. De facto, podem causar a peroxidação lipídica, resultando no rompimento de membranas celulares, com libertação de enzimas lisossomais, e a oxidação do ADN, originando mutações génicas, e de aminoácidos, levando a disfunção enzimática ou proteólise.³⁰ Estas espécies estão também envolvidas em vários processos, como inflamação, mutagénese, cancro, envelhecimento e lesão de repercussão isquémica.³¹⁻³²

Por outro lado, o aumento do nível de ácido úrico pode levar à deposição de cristais na forma de urato monossódico nas articulações e nos rins, o que provoca uma condição de hiperuricemia designada gota.³³⁻³⁴

Assim, a procura de inibidores da XO e também de sequestradores dos radicais livres produzidos tem tido elevado interesse.³¹ Desta forma, garantir a inibição da enzima e simultaneamente controlar a produção de ROS tem sido um desafio também ao nível da química medicinal.^{28, 31}

Atualmente, são conhecidos alguns inibidores da XO, destacando-se o alopurinol (1,5-dihidro-4-*H*-pirazolo[3,4-*d*] pirimidina-4-ona), o febuxostat ((ácido 2-[3-ciano-4-(2-metilpropoxi) -fenilo] -4-metiltiazole-5-carboxílico)) e o FYX-051 (4-[5-(piridin-4-il)-1H-1,2,4-triazole-3-il]piridina-2-carbonitrilo). O alopurinol, um inibidor purínico, foi o primeiro inibidor aprovado pela FDA em 1966, e continua a ser um dos fármacos mais usados para o tratamento da gota. Por outro lado, o febuxostat, um inibidor não purínico, é mais potente e seletivo

comparativamente ao alopurinol.³⁵ O FYX-051 é também um inibidor não purínico que se encontra em fase II de ensaios clínicos (figura 1.5).³⁶

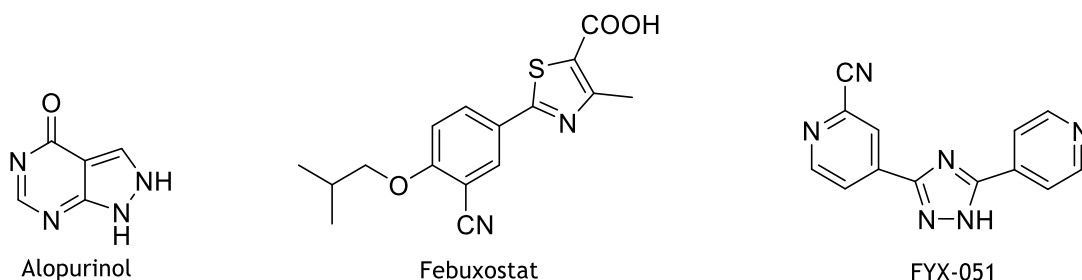


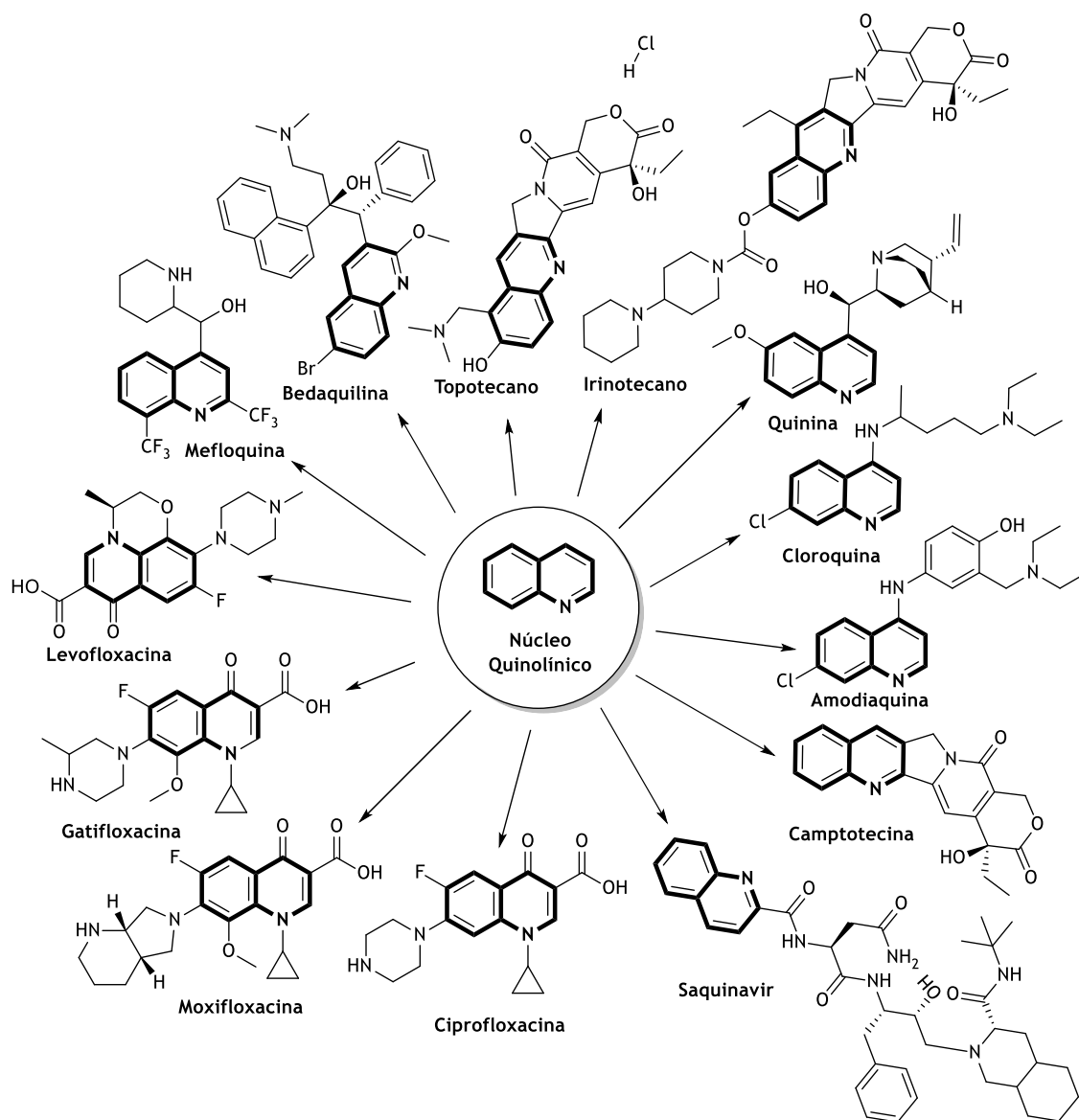
Figura 1.5 - Exemplos de inibidores da XO, adaptado de Kumar e Matsumoto *et al.*³⁵⁻³⁶

Independentemente do ensaio escolhido ser baseado em células ou um ensaio bioquímico é necessário ter em consideração os seguintes fatores:

- Relevância farmacológica;
- Reprodutibilidade do ensaio;
- Custos;
- Qualidade e efeitos dos compostos no ensaio.⁵

1.2. Quinolinas

Os compostos heterocíclicos são uma classe amplamente presente na natureza e muito importantes, nomeadamente, no metabolismo celular. Uma grande parte destes compostos, de origem sintética ou natural, são farmacologicamente ativos e, portanto, utilizados na clínica.³⁷ O núcleo quinolínico, conjuntamente com os seus derivados, constituem um bom exemplo disso (esquema 1.3). Atualmente, as quinolinas e os seus derivados têm demonstrado grande interesse para comunidade científica em geral, uma vez que tanto a nível sintético como biológico demonstram diversas propriedades químicas e farmacológicas interessantes.³⁸ De facto, o sistema do anel quinolina está presente em diversos produtos naturais, essencialmente em alcaloides, sendo utilizado para o *design* de novos fármacos com atividades biológicas promissoras.³⁸⁻³⁹ Dentro das diversas atividades biológicas que estes apresentam, destacam-se os seus efeitos antibacterianos, antiparasitários, anticancerígenos, anti-hipertensivos, antimaláricos e inibidores das colinesterases.⁴⁰



Esquema 1.3 - Exemplos representativos de fármacos utilizados na clínica que contêm o núcleo de quinolina. Adaptado de Mandewale *et al.*⁴¹

Durante os últimos anos, têm sido realizadas várias tentativas para a síntese de agentes anticancerígenos mais potentes e seletivos. Neste âmbito, a radioterapia tem sido acoplada a fármacos anticancerígenos, embora estes métodos nem sempre permitam alcançar o sucesso desejado. Assim, continua a haver a necessidade de desenvolver um fármaco potente que permita matar ou inibir o crescimento de células cancerígenas. Por outro lado, é fulcral garantir que o mesmo não interfira com as células saudáveis. As quinolinas e os seus derivados têm também sido um dos focos para tentar ultrapassar esses desafios (ver exemplo da camptotecina no esquema 1.3).⁴¹

Sinteticamente, as quinolinas podem ser preparadas de várias formas. Neste contexto, a quinolina, 1-aza-naftaleno ou benzo[*b*]piridina, é um composto heterocíclico aromático com forma molecular de C_9H_7N .⁴² A sua estrutura contém um anel aromático fundido com um anel

de piridina em dois átomos de carbono adjacentes.^{39, 42} A descoberta das quinolinas ocorreu em 1842 por Gerhardt, como resultado da decomposição de dois alcaloides, nomeadamente a quinina e a cinchonina (figura 1.6).⁴³ Em 1880, a reação de Skraup, para a obtenção da quinolina, teve um grande impacto e ainda hoje é um grande clássico da química orgânica.

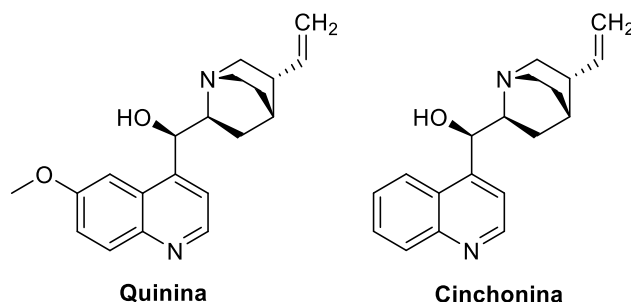
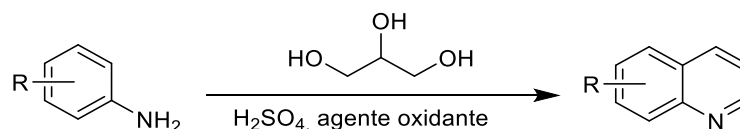


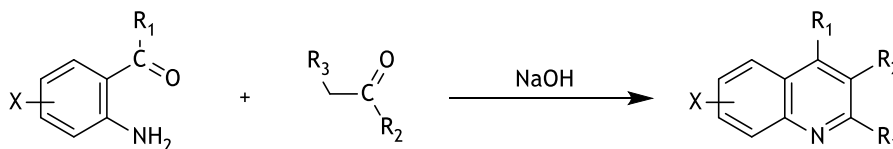
Figura 1.6 - Estruturas químicas da quinina e cinchonina. Adaptado de Olsen e Igarashi *et al.*⁴⁴⁻⁴⁵

Assim, para a obtenção do esqueleto quinolínico faz-se reagir uma amina aromática (por exemplo a anilina) com glicerol na presença de ácido sulfúrico e de um agente oxidante (esquema 1.4). Como agente oxidante pode ser utilizado o ácido arsénico, óxido férrico ou ácido pícrico.⁴³



Esquema 1.4 - Síntese de derivados de quinolinas através da reação de Skraup. Adaptado de Manske *et al.*⁴³

Mais tarde, em 1882, Friedländer preparou quinolinas através da condensação entre *o*-amino-benzaldeído e um acetaldeído, na presença de hidróxido de sódio (esquema 1.5).⁴⁶



Esquema 1.5 - Síntese de derivados da quinolina por condensação de *o*-aminobenzaldeídos e acetaldeídos. Adaptado de Cheng *et al.*⁴⁶

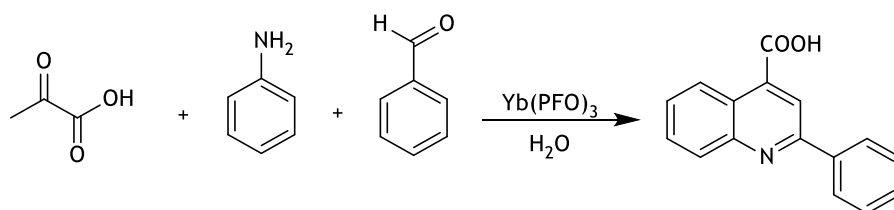
Outros métodos foram desenvolvidos para a obtenção destes compostos, nomeadamente por Doebner von Miller, Pfitzinger, entre outros. No entanto, estas vias sintéticas têm alguns problemas associados, sendo o desenvolvimento de métodos mais simples uma constante. Entre os problemas mais comuns associados a estas sínteses, destacam-se:⁴⁷

- Condições reacionais severas;
- Elevados tempos de reação;
- Utilização de solventes orgânicos nocivos;
- Baixos rendimentos;
- Dificuldade no isolamento.

Os derivados de quinolinas, como já referido anteriormente, apresentam uma elevada gama de aplicações. Neste contexto, existem diversos métodos que permitem modificar o anel de quinolina de forma a obter vários derivados que, possam desempenhar diferentes atividades biológicas.⁴² Seguidamente, serão revistos vários métodos para a obtenção de derivados de quinolinas, nomeadamente derivados di- e tri-substituídos e cíclicos.

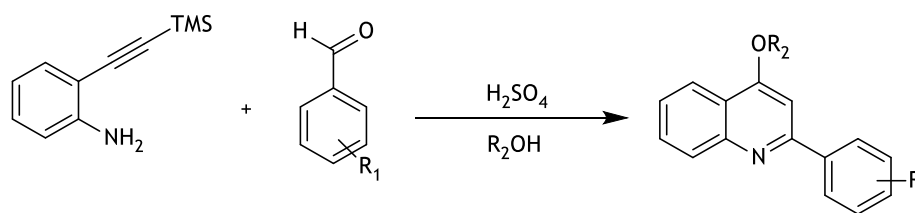
1.2.1. Síntese de derivados de quinolina di-substituídos

Um exemplo de quinolinas 2,4-disubstituídas, é o ácido 2-fenilquinolino-4-carboxílico. Este, pode ser sintetizado numa reação de multicomponentes a partir do ácido 2-oxopropiónico, da anilina e do benzaldeído, na presença de um catalisador metálico (esquema 1.6). Os autores referem a utilização de outros catalisadores, sendo o perfluoro-octanoato de zinco [Zn(PFO)₂], perfluoro-octanoato de ferro [Fe(PFO)₃] e o perfluoro-octanoato de lantânio [La(PFO)₃] exemplos de catalisadores utilizados na síntese. Contudo, o perfluoro-octanoato de itérbio [Yb(PFO)₃] é um catalisador importante na síntese mencionada, uma vez que este foi o que apresentou melhores rendimentos.⁴⁸



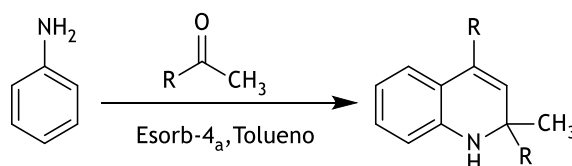
Esquema 1.6 - Síntese do ácido 2-fenilquinolino-4-carboxílico. Adaptado de Wang *et al.*⁴⁸

A condensação e ciclização da 2-(2-trimetilsilil)etnil)anilina com um arilaldeído, na presença de ácido sulfúrico em metanol permite a preparação de outras 2-fenilquinolinas, nomeadamente substituídas com um grupo alcoxi na posição 4 do núcleo quinolínico (esquema 1.7).⁴⁹



Esquema 1.7 - Síntese das 2-fenil-4-alcoxiquinolinas. Adaptado de Wang *et al.*⁴⁹

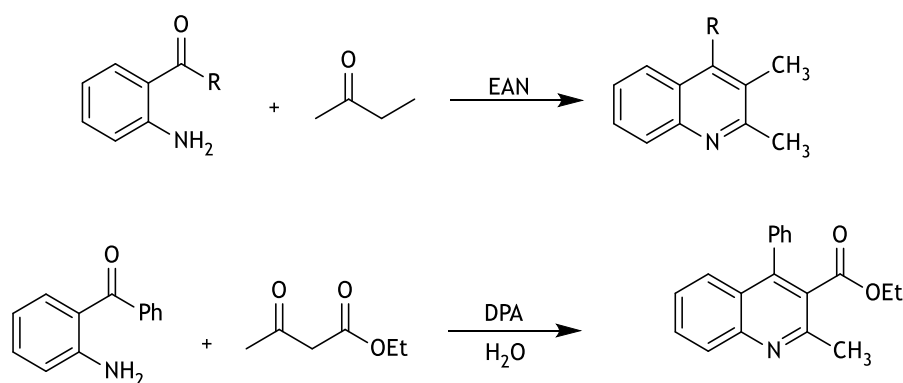
Outras quinolinas 2,4-disubstituídas, as 2,4-difenil-2-metil-1,2-di-hidroquinolina, podem ser preparadas através de uma reação entre a anilina e uma acetofenona, na presença de um catalisador com poros de dimensão reduzida, o Esorb-4_a (E4_a) (esquema 1.8). Este catalisador contém uma alteração do catalisador E4, relativa à acidez (pH≥3), que permite adsorver moléculas como a água, o metanol, entre outras. Os mesmos autores, referem ainda a possibilidade de alteração das acetofenonas por outras cetonas alifáticas, recorrendo às mesmas condições reacionais.⁵⁰



Esquema 1.8- Síntese de derivados da 2-metil-1,2-di-hidroquinolina, a partir da reação entre a anilina e uma cetona. Adaptado de Hegedüs *et al.*⁵⁰

1.2.2. Síntese de derivados de quinolina tri-substituídos

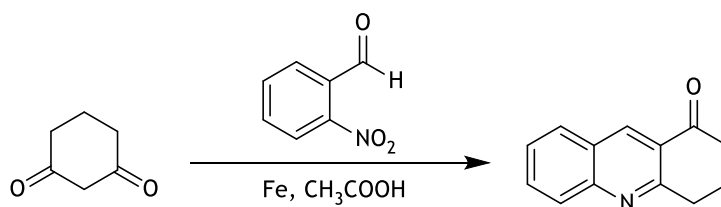
De forma a preparar quinolinas 2,3,4-trisubstituídas, Chen e colaboradores fizeram reagir cetonas aromáticas que contenham um grupo amina na posição *orto*, com compostos carbonílicos que tenham um grupo α-metileno reativo em nitrato de amónio etílico (EAN). Mais tarde, Ghassamipour e Sardarian apresentaram condições reacionais relativamente mais suaves, utilizando um catalisador. Neste caso, o ácido dodecilsulfónico (DPA) é apresentado pelos autores como um catalisador reciclável, permitindo ainda a realização da reação em água ou sem solvente (esquema 1.9).⁴²



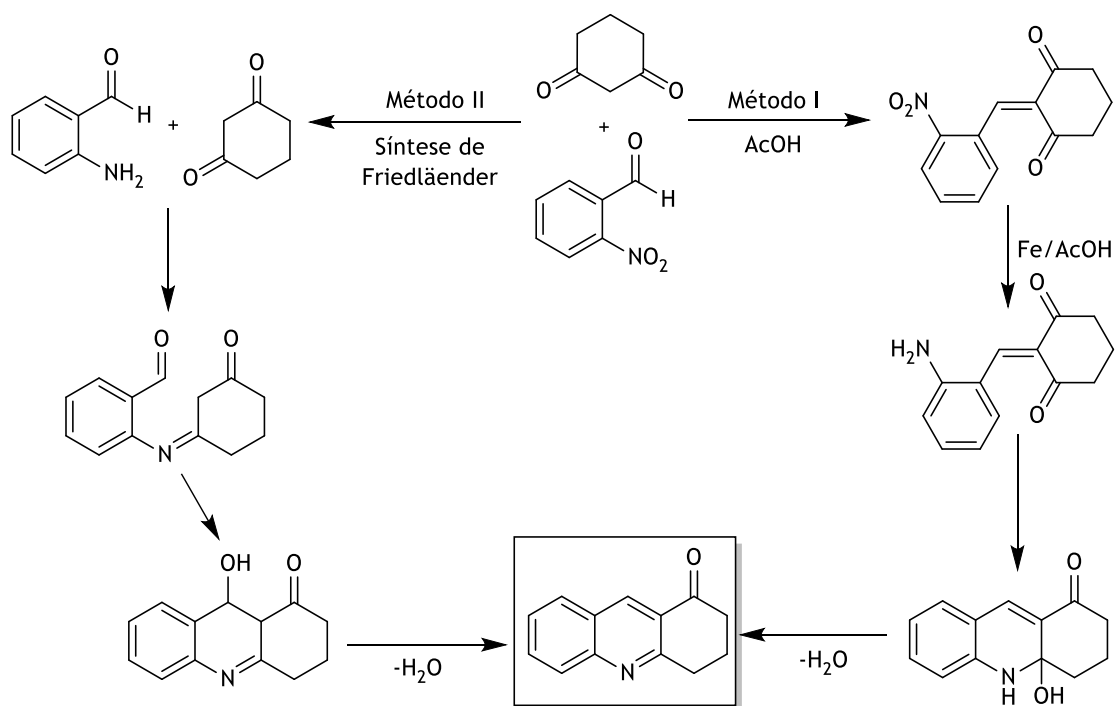
Esquema 1.9 - Síntese de quinolinas 2,3,4-trissubstituídas. Adaptado de Zhou *et al.*⁵¹ e Ghassamipour *et al.*⁵²

1.2.3. Síntese de derivados de quinolina cíclicos

A maioria dos métodos descritos para a obtenção de quinolinas cíclicas envolvem muitos passos para a obtenção dos precursores. Uma das formas mais simples para estas sínteses envolve uma heterociclicização reductiva, utilizando o 2-nitrobenzaldeído e a ciclohexan-1,3-diona, na presença ferro e ácido acético em aquecimento (esquema 1.10). O ferro e o ácido acético continuam a ser reagentes muito utilizados em reações de redução, uma vez que têm um baixo custo, são fáceis de obter e por outro lado, são relativamente seguros a nível ambiental. A reação abaixo mencionada, baseia-se na reação mais utilizada na síntese de quinolinas: a reação de Friedländer. Esta, compreende a condensação de cetonas α -metilénicas com 2-aminobenzaldeídos, no entanto, estes últimos nem sempre são compostos estáveis. Assim, o método descrito por Rajawinslin *et al.*, torna-se mais vantajoso, uma vez que engloba não só uma condensação de Knoevenagel, como também uma reação intermediária de redução do nitro a amina *in situ*, ultrapassando assim o problema de estabilidade destes *o*-aminobenzaldeídos e o problema de obtenção de precursores em múltiplos passos (esquema 1.11).⁴⁰

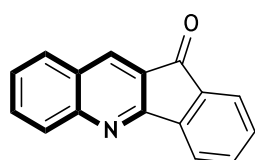


Esquema 1.10 - Reação de ciclização para a obtenção da quinolina correspondente. Adaptado de Rajawinslin *et al.*⁴⁰

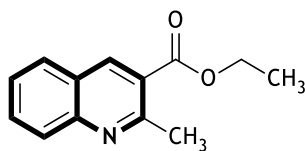


Esquema 1.11 - Mecanismo possível para a síntese de derivados de quinolina. Adaptado de Rajawinslin *et al.*⁴⁰

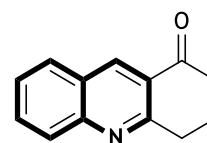
Estes derivados cíclicos podem sofrer diversas modificações estruturais, tornando-se moléculas bioativas. Como já aqui descrito, são diversas atividades que estes compostos possuem, nomeadamente como antibacterianos, antiparasitário, anticancerígenos, inibidores de colinesterases, entre outros (figura 1.7).⁴⁰



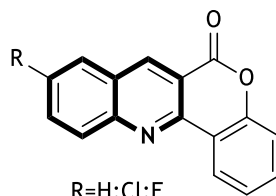
Antibacteriano



Antiparasitário



Inibidores da colinesterase



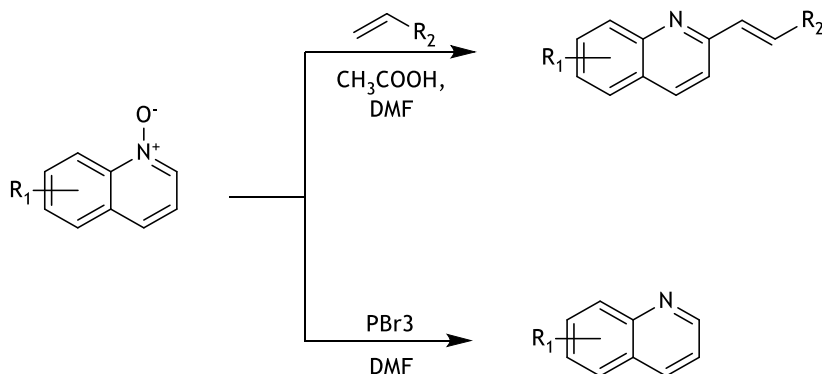
R=H;Cl;F

Anticancerígenos

Figura 1.7 - Algumas aplicações dos derivados de quinolina. Adaptado de Rajawinslin *et al.*⁴⁰

1.2.4. Redução de *N*-óxidos de quinolina

A partir de *N*-óxidos de quinolina, podem ser obtidas as quinolinas correspondentes. De seguida são apresentados alguns exemplos dessa transformação (esquema 1.12).



Esquema 1.12 - Síntese de derivados de quinolina a partir do *N*-óxido de quinolina. Adaptado de Hong Xia *et al* e Familoni *et al*.⁵³⁻⁵⁴

Hong Xia *et al.*, descreveram que a síntese de quinolinas com uma ramificação alquílica pode ser obtida através de catálise ácida entre o *N*-óxido de quinolina e um alceno terminal.⁵³ Outra forma de obtenção destes derivados a partir de *N*-óxidos de quinolina, foi descrita por Familoni *et al.*, na presença de tribrometo de fósforo (PBr_3).⁵⁴

1.3. *N*-óxidos de Quinolinas

Os compostos orgânicos desempenham um papel fundamental na medicina e na biologia uma vez que estão envolvidos em processos biológicos. As moléculas estruturalmente similares são designadas de estruturas privilegiadas e a substituição de grupos funcionais nas mesmas pode contribuir para uma melhoria das propriedades farmacológicas e físico-químicas, permitindo o desenvolvimento de novos fármacos. Um exemplo dessas alterações é a *N*-oxidação heterocíclica de compostos bioativos *N*-heterocíclicos, na qual a *N*-oxidação pode levar a melhorias nas propriedades desejadas.⁵⁵ No início dos anos 60, a empresa farmacêutica Upjohn descobriu ao acaso o minoxidilo, um *N*-óxido de quinolina com atividade anti-hipertensiva (figura 1.8).

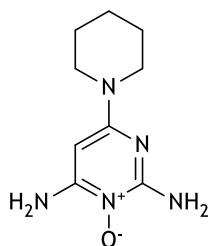


Figura 1.8 - Estrutura química do minoxidilo. Adaptado de Mfuh *et al*.⁵⁵

Desde então, a reatividade química e a atividade biológica dos *N*-óxidos de quinolina têm sido alvo de grande interesse. De facto, estes compostos apresentam diversas aplicações como intermediários sintéticos e também são biologicamente importantes como agentes antibacterianos, antivirais, anticancerígenos e antifúngicos.⁵⁵⁻⁵⁶ Os *N*-óxidos heterocíclicos são relevantes em quatro áreas terapêuticas, uma vez que são:

- Miméticos do óxido nítrico;
- Bioisósteros do grupo carbonilo;
- Doadores do óxido nítrico;
- Atuam como citoxinas seletivas no processo de hipoxia.

Além disso, estes heterocíclicos não só são importantes na indústria farmacêutica, como também na indústria de cosméticos e de produtos agroquímicos.^{55, 57} Atualmente, são conhecidos alguns fármacos que pertencem a esta classe, destacando-se o ancriviroc, e o otamixaban (figura 1.9). O primeiro é um inibidor do recetor de quimiocina (CCR5), impedido a entrada do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) nas células.⁵⁸ Este fármaco foi descrito a primeira vez pela empresa Schering-Plough, em 2002.^{55, 59} O otamixaban é um inibidor direto do fator Xa, sendo este importante na coagulação sanguínea.⁵⁸

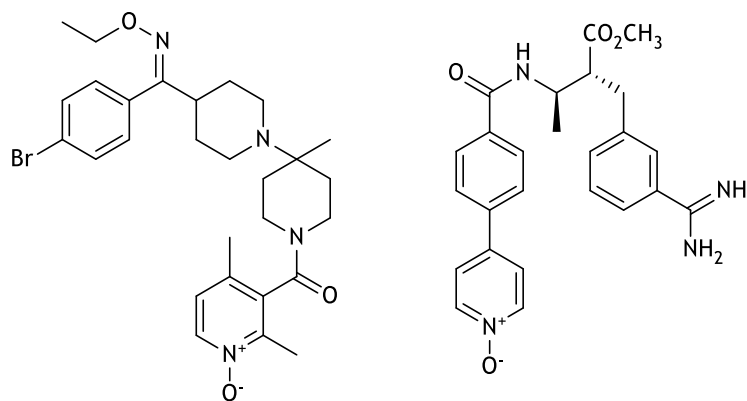
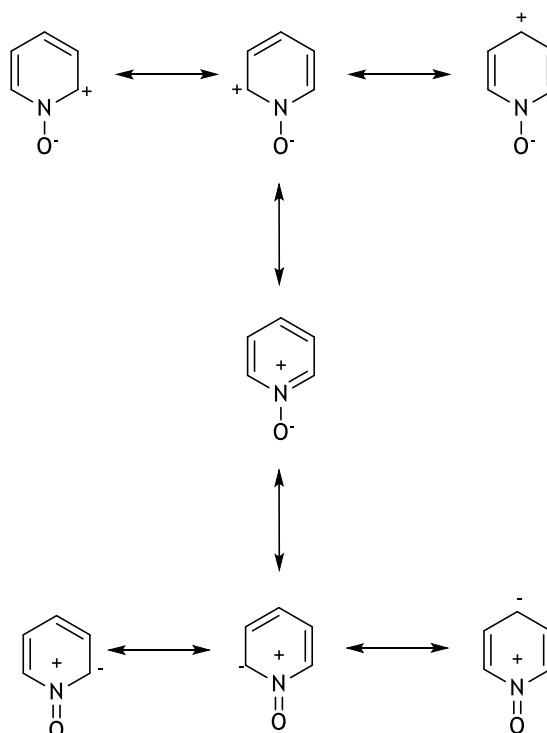


Figura 1.9 - Estrutura química do ancriviroc, e do otamixaban. Adaptado de Lariovon *et al* e de Mfuh *et al*.^{55, 58}

Quimicamente, os *N*-óxidos heteroaromáticos possuem um átomo de azoto ligado a um átomo de oxigénio, onde o átomo de azoto está inserido no anel heteroaromático. O oxigénio encontra-se carregado negativamente, permitindo um impacto relevante nas propriedades físicas e reatividades do anel. Estas propriedades podem ser justificadas pela deslocalização de eletrões da sua estrutura (esquema 1.13).⁶⁰

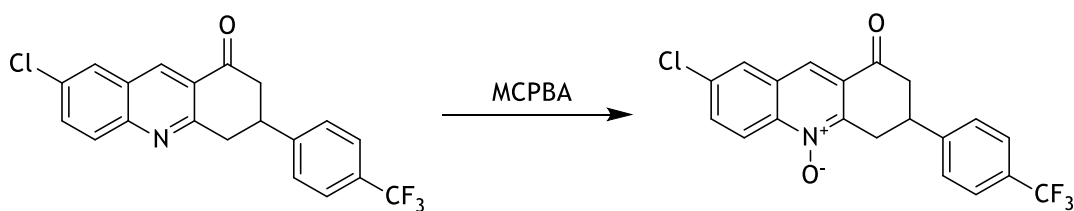


Esquema 1.13 - Estruturas canônicas do *N*-óxido. Adaptado de Wang *et al.*⁶⁰

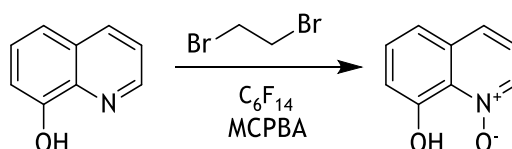
Assim, *N*-óxidos heteroaromáticos podem ser preparados a partir da oxidação direta de heteroarenos impedidos ou através da construção de anéis heteroaromáticos.

1.3.1. Síntese de *N*-óxidos de Quinolinas por oxidação direta de quinolinas

Tal como a síntese de quinolinas pode ser realizada a partir da redução de *N*-óxidos de quinolina, o passo reverso pode igualmente ocorrer, por oxidação. A oxidação direta de quinolinas nos derivados *N*-óxidos de quinolina pode ser realizado com oxidantes fortes como o ácido *m*-cloroperoxibenzóico (MCPBA), o monoperftalato de magnésio, ácidos percarboxílicos gerados *in situ* e o dimetildioxirano.^{58, 60} O primeiro, é um dos oxidantes mais utilizados neste tipo de reações químicas. Em 1992, Kesten *et al.* sintetizaram uma série de quinolonas e *N*-óxidos de quinolina com potencial atividade antimalárica. Estes derivados *N*-óxidos são um exemplo da aplicação do mencionado (esquema 1.14).⁶¹ Já em 2003, Jana e Verkade descreveram um método em 1,2-dibromoetano que permitiu o aumento do rendimento de formação de alguns *N*-óxidos de quinolina. Um desses casos é a formação do *N*-óxido de 8-hidroxiquinolina (esquema 1.15).⁶²

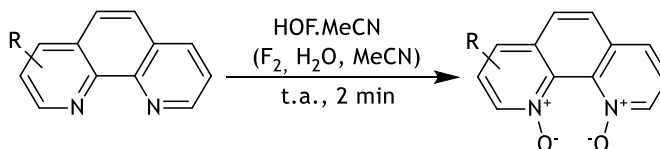


Esquema 1.14 - Síntese de *N*-óxido de quinolina com potencial antimalárico, a partir da quinolina correspondente. Adaptado de Kesten *et al.*⁶¹



Esquema 1.15 - Síntese de *N*-óxido a partir da quinolina correspondente. Adaptado de Jana *et al.*⁶²

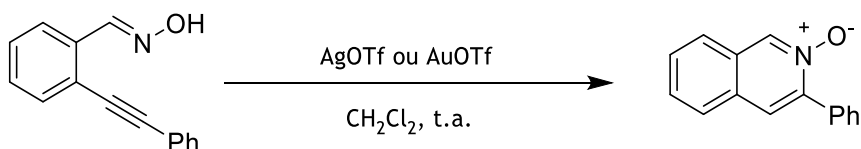
Contudo, como referido anteriormente, na maioria das vezes a utilização de MCPBA traduz-se num baixo rendimento, verificando-se uma dificuldade em remover o subproduto formado, o ácido clorobenzóico.^{58, 60} Em 1998, Sharpless e os seus colaboradores desenvolveram uma oxidação estequiométrica catalisada por metiltioxorénio de peróxido de hidrogénio. Apesar do método apresentado ser eficiente para piridinas e quinolinas, quando existia impedimento estereoquímico tal facto já não se verificava.^{60, 63} Para sistemas onde há necessidade de torcer as ligações, não são utilizados os oxidantes acima descritos. Um desses exemplos é o caso da 1,10-fenantrolina, em que para se obter o seu derivado *N,N'*-dióxido é utilizado outro método que envolve o complexo de ácido hipofluoroso e acetonitrilo, o $\text{HOF} \cdot \text{CH}_3\text{CN}$, um bom agente de transferência de oxigénio. Sendo rápido, demonstrando bons rendimentos e ultrapassando os problemas associados à oxidação de diversas moléculas altamente impedidas, este método torna-se altamente vantajoso (esquema 1.16).⁶⁰



Esquema 1.16 - Formação do *N,N'*-dióxido de 1,10-fenantrolina. Adaptado de Wang *et al.*⁶⁰

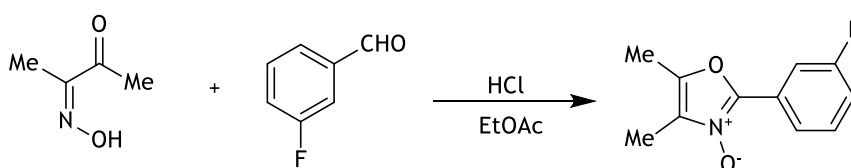
1.3.2. Síntese de *N*-óxidos de Quinolinas por heterociclização

Os *N*-óxidos de *N*-heteroareno são preparados a partir de substratos com ligações de oxigénio-azoto pré-existentes. Um exemplo desta situação é a preparação direta de *N*-óxidos de isoquinolina a partir de *orto*-alcinilbenzaldoximas, através de catalisadores como complexos de ouro ou triflato de prata (esquema 1.17).⁶⁰



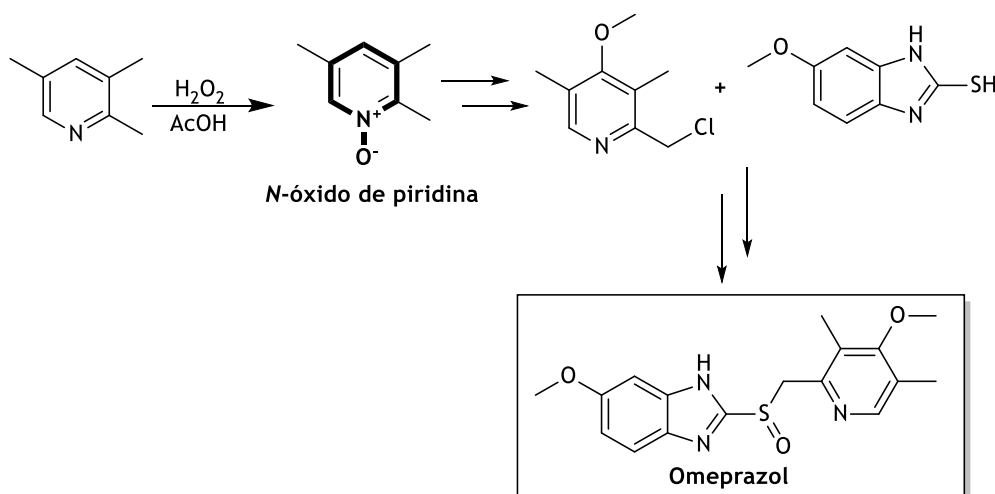
Esquema 1.17 - Formação de um *N*-óxido de isoquinolina a partir de uma *orto*-alcinilbenzaldoxima. Adaptado de Wang *et al.*⁶⁰

As oxidações diretas de compostos imidazólicos para formar os seus derivados *N*-óxidos são muito limitadas. Não obstante, estes compostos podem ser obtidos através da condensação entre α -ceto-oximas e iminas. Uma estratégia semelhante, é a preparação de *N*-óxidos de oxazole a partir de α -ceto oximas e aldeídos, sob condições ácidas (esquema 1.18).⁶⁰



Esquema 1.18 - Formação de um *N*-óxido de oxazole a partir de uma α -ceto oxima e um benzaldeído. Adaptado de Wang *et al.*⁶⁰

Estes compostos são usados como ligandos e catalisadores que participam na síntese de fármacos como intermediários, como é caso do omeprazol (esquema 1.19). Por outro lado, são também importantes como novos farmacóforos, permitindo a descoberta de novos fármacos.⁵⁸



Esquema 1.19 - Síntese do omeprazol a partir da oxidação da 2,3,5-colidina ao seu derivado *N*-óxido. Adaptado de Vardanyan *et al.*⁶⁴

Capítulo 2 - Objetivos

O principal objetivo inicial da presente dissertação era a generalização da síntese de derivados de 2,1-benzisoxazóis a partir de núcleos não barbituratos, uma vez que a sua síntese já tinha sido realizada a partir de barbituratos.

No decorrer deste trabalho, esse objetivo não foi atingido uma vez que ocorreu a formação não esperada de *N*-óxidos de quinolina. Assim, e em função deste novo resultado, que só por isso abria uma nova via sintética de *N*-óxidos de quinolina por métodos não oxidativos, foram traçados novos objetivos, nomeadamente:

- O desenvolvimento de *N*-óxidos de quinolina, a partir de derivados de 2-nitrobenzilidenos e de 2-nitrofenilmetilenos.;
- Caracterização estrutural dos *N*-óxidos de quinolina e seus precursores;
- Avaliação biológica dos 5-(benzisoxazol-3-ilideno)pirimidinas, dos *N*-óxidos de quinolina e seus precursores, nomeadamente para determinação da sua capacidade inibitória da atividade da enzima XO e da sua citotoxicidade em fibroblastos normais da derme humana (NHDF - do *inglês Normal Human Dermal Fibroblast*) e em células epiteliais humanas do cancro da mama sensíveis a estrogénios (MCF-7 - do *inglês Michigan Cancer Foundation-7, human breast adenocarcinoma cell line*);
- Complementar os ensaios biológicos com estudos *in silico*, sempre que possível.

Capítulo 3 - Resultados e discussão

3.1. Síntese

Nesta secção serão apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos na preparação e tentativa de obtenção de quinolinas e seus derivados *N*-óxidos, assim como dos seus precursores.

Na apresentação dos resultados faz-se uma breve referência e explicação às sínteses ou tentativas realizadas ao longo deste trabalho de dissertação, discute-se a caracterização estrutural e outros aspetos tais como os mecanismos envolvidos, em especial do caso das novas vias sintéticas.

Desta forma, na subsecção 3.1.1, serão apresentados os resultados obtidos na preparação de 5-(2-nitrobenzilideno)pirimidinas utilizadas como precursores na síntese de benzisoxazóis. Na subsecção 3.1.2 serão demonstrados os resultados para a síntese de 5-(benzisoxazol-3-ilideno)pirimidinas. Na subsecção 3.1.3 serão apresentados os resultados e tentativas de síntese para a obtenção de 2-nitrobenzilidenos derivados de 1,3-dicarbonilos, cíclicos e acíclicos respetivamente, os quais não se inserem nos derivados de pirimidinas, sendo estes igualmente utilizados como potenciais precursores na síntese de benzisoxazóis. Contudo, após a redução desses 2-nitrobenzilidenos derivados de 1,3-dicarbonilos (cíclicos e acíclicos), verificou-se a formação inesperada de *N*-óxidos de quinolina e, portanto, explorou-se essa nova via sintética para a obtenção dos mesmos.

Na subsecção 3.1.4 serão demonstrados os resultados obtidos para a síntese de 2-nitrofenilmetilenos derivados de 1,3-dicarbonilos, que após redução verificou-se também em alguns casos a formação não esperada de *N*-óxidos de quinolina. Desta forma, desenvolveu-se a preparação de derivados de 2-nitrofenilmetilenos dos mesmos núcleos 1,3-dicarbonilos tal como utilizados para a preparação de 2-nitrobenzilidenos derivados de 1,3-dicarbonilos.

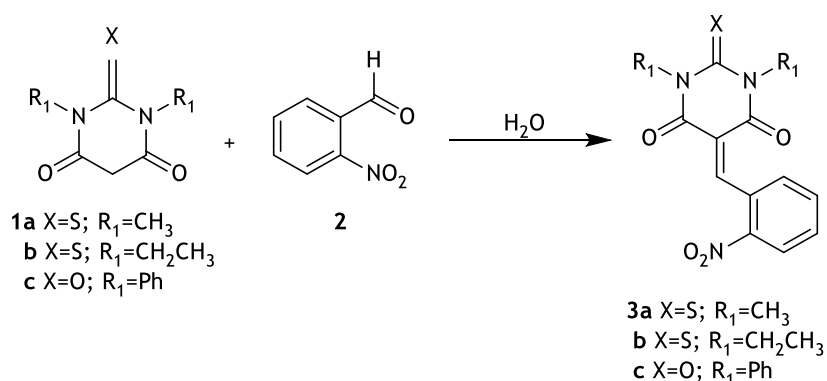
De uma maneira geral, nas tabelas de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN de ^1H) são apresentados a multiplicidade do sinal [s (singuleto), d (duplete), dd (duplo duplete), ddd (duplo duplo duplete), t (triplete), dt (duplo triplete), m (multiplete) e dddd (duplo duplo duplo duplete)], a intensidade relativa (nH, onde n corresponde ao número de prótons), a constante de acoplamento [*J*, em Hertz (Hz)] e a atribuição do próton na molécula, em alguns casos. Para RMN de ^{13}C (Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C) é apresentado o desvio químico [δ , em partes por milhão (ppm)] e a atribuição do carbono na molécula, em alguns casos. Esta atribuição foi, em alguns casos, estabelecida com o auxílio da técnica de intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização (DEPT- do inglês, *Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer*), tal como dos espectros de correlação heteronuclear a uma ligação (HSQC - do inglês, *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) e correlação heteronuclear a múltiplas ligações (HMBC - do inglês, *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*), sendo utilizados para a realização dos mesmos os seguintes solventes, DMSO- d_6 (dimetilsulfóxido hexadeuterado) ou CDCl_3 - d (clorofórmio deuterado). Para os espectros de infravermelho por

transformada de Fourier (FTIR - do inglês, *Fourier transform infrared spectroscopy*), as bandas características foram atribuídas de acordo com o descrito na literatura.⁶⁵

3.1.1. 5-(2-Nitrobenzilideno)pirimidinas 3a-c

A síntese dos derivados de 5-(2-nitrobenzilideno)pirimidinas **3** abaixo apresentados teve como objetivo a sua utilização como precursores na síntese de 5-(benzisoxazol-3-ilideno)pirimidinas **4**.

A obtenção das 5-(2-nitrobenzilideno)pirimidinas **3** envolve uma reação do tipo Knoevenagel que, neste caso particular, consiste na adição do 2-nitrobenzaldeído (**2**) a um ácido 1,3-dissubstituído (ácido(tio)barbitúrico) **1a-c** (esquema 3.1). Para esta síntese foi utilizado um método que envolve um procedimento experimental simples e com a utilização de água como solvente.⁶⁶ Uma vez que o produto precipita ao longo da sua formação, o isolamento é rápido e fácil obtendo-se rendimentos bons, à exceção da 5-(2-nitrobenzilideno)pirimidina **3b** (tabela 3.1).



Esquema 3.1 - Síntese das 5-benzilidenopirimidinas **3a-c**.

Os pontos de fusão obtidos apresentam pequenos intervalos de fusão o que indica a ausência de impurezas em percentagem significativa (tabela 3.1). Por outro lado, os espectros de FTIR das 5-(2-nitrobenzilideno)pirimidinas **3** apresentam as bandas características, esperadas em função dos grupos principais presentes, nomeadamente referentes à ligação C=O associada às vibrações de deformação axial e o grupo NO₂, associado a bandas fortes de deformação axial assimétrica e simétrica (tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Bandas caraterísticas dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para os compostos **3a-c**.

Composto	FTIR (bandas caraterísticas em cm ⁻¹)	Ponto de fusão (°C)	Literatura (°C)	η (%)
3a	1678 (C=O); 1342 e 1518 (NO ₂)	161-162	a)	83
3b	1677 (C=O); 1343 e 1524 (NO ₂)	124-125	a)	20
3c	1681 (C=O); 1355 e 1519 (NO ₂)	239-240	a)	82

a) Não descrito.

Os espectros de RMN de ¹H das 5-(2-nitrobenzilideno)pirimidinas **3a-c** apresentam todos os sinais esperados, nomeadamente os singletos característicos, a 8,78, 8,74 e 8,82 ppm para **3a**, **3b** e **3c**, respetivamente (tabela 3.2). Através da análise do espectro de RMN de ¹³C, confirma-se a presença dos sinais correspondentes à ligação C=O das 5-(2-nitrobenzilideno)pirimidinas, (tabela 3.1). Por outro lado, as **3a**, **3b** e **3c** apresentam um sinal a 155,78, 155,38 e 154,56 ppm respetivamente, que é típico do carbono 5. De destacar que por análise do espectro de RMN de ¹H, verifica-se que todos as 5-(2-nitrobenzilideno)pirimidinas **3a-c** apresentam assimetria, a qual não é verificada no espectro de RMN de ¹³C. É importante ainda referir que os substituintes do anel pirimidínico não têm grande influência nos desvios químicos no espectro de RMN (tabelas 3.2 e 3.3).

Tabela 3.2 - RMN de ^1H das 5-(2-Nitrobenzilideno)pirimidinas **3a-c**, em $\text{DMSO}-d_6$.

Composto	5-CCH <i>J</i> em Hz	3'-ArCH <i>J</i> em Hz	5'-ArCH <i>J</i> em Hz	4'-ArCH <i>J</i> em Hz	6'-ArCH <i>J</i> em Hz	Outros sinais <i>J</i> em Hz
3a	8,78 (s, 1H)	8,28 (d, 1H, <i>J</i> = 8,3 Hz)	7,83 (t, 1H, <i>J</i> = 7,5 Hz)	7,72 (t, 1H, <i>J</i> = 7,9)	7,60 (d, 1H, <i>J</i> = 7,7 Hz)	3,67 (s, 3H, NCH ₃) 3,48 (s, 3H, NCH ₃) 4,42 (q, 2H, <i>J</i> = 7,0 Hz, NCH ₂ CH ₃) 4,24 (q, 2H, <i>J</i> = 7,0 Hz, NCH ₂ CH ₃) 1,24 (t, 3H, <i>J</i> = 6,9 Hz, NCH ₂ CH ₃) 1,09 (t, 3H, <i>J</i> = 6,9 Hz, NCH ₂ CH ₃)
3b	8,74 (s, 1H)	8,27 (d, 1H, <i>J</i> = 8,3 Hz)	7,81 (t, 1H, <i>J</i> = 7,6 Hz)	7,70 (t, 1H, <i>J</i> = 7,9)	7,62 (d, 1H, <i>J</i> = 7,7 Hz)	7,71-7,61 (m, 2H, ArCH) 7,57-7,50 (m, 2H, (ArCH) ₂) 7,49-7,36 (ArCH) ₆) 7,34-7,27 (ArCH) ₂)
3c	8,82 (s, 1H)	8,25 (dd, 1H, <i>J</i> = 8,2 e 1,2 Hz)	7,82 (td, 1H, <i>J</i> = 7,6 e 1,2 Hz)	a)	a)	

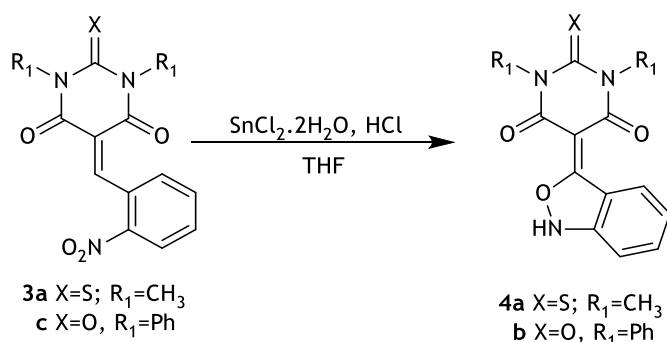
a) Indefinido

Tabela 3.3 - RMN de ^{13}C das 5-(2-Nitrobenzilideno)pirimidinas **3a-c**, em $\text{DMSO}-d_6$.

Composto	C=O	5-CCH	2'-ArC	5'-ArC	1'-ArC	4'-ArCH	6'-ArCH	3'-ArCH	5-C	Outros sinais
3a	160,10 e 158,60	155,78	146,14	34,00	131,97	130,36	130,04	124,12	120,47	180,92 (C=S); 35, 54 e 34,96 (NCH ₃)
3b	159,46 e 158,04	155,38	146,21	134,00	131,92	130,38	130,14	124,13	120,64	179,42 (C=S); 43,32 e 42,75 (NCH ₂ CH ₃); 12,15 e 11,99 (NCH ₂ CH ₃)
3c	161,86 e 160,63	154,56	146,67	134,49	132,36	130,69	130,64	124,58	121,45	129,42, 129,32, 129,25, 129,02 e 128,86 (ArCH); 135,98 e 135,62 (ArC); 151,05 (2-CO)

3.1.2. 5-(Benzisoxazol-3-ilideno)pirimidinas 4a-b

Para a obtenção das 5-(benzisoxazol-3-ilideno)pirimidinas **4**, utilizou-se cloreto de estanho di-hidratado e ácido clorídrico concentrado em tetrahidrofurano (THF), de acordo com o método descrito por Serrano *et al.*,⁶⁶ utilizando-se THF em alternativa ao metanol (esquema 3.2). Este método é bastante simples e permite que o produto se forme rapidamente. Assim, o isolamento é fácil e permite obter bons rendimentos entre 73 e 84% (tabela 3.4).



Esquema 3.2 - Síntese das 5-(benzisoxazol-3-ilideno)pirimidinas **4a-b**.

Os pontos de fusão obtidos apresentam pequenos intervalos de fusão o que indica a ausência de impurezas em percentagem significativa (tabela 3.4). Por outro lado, os espectros de FTIR das 5-(benzisoxazol-3-ilideno)pirimidinas **4** apresentam as bandas características, nomeadamente a 1060 e 1656 cm⁻¹ de **4a** e **4b**, respetivamente, correspondente à ligação C=O associada às vibrações de deformação axial, duas bandas a 1447 e 1520 cm⁻¹ e 1356 e 1474 cm⁻¹ para **4a** e **4b**, respetivamente, características do grupo NO₂ correspondente a bandas fortes de deformação axial assimétrica e simétrica, respetivamente (tabela 3.4).

Tabela 3.4 - Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para os compostos **4a-b**.

Composto	FTIR (bandas características em cm ⁻¹)	Ponto de fusão (°C)	Literatura (°C)	η (%)
4a	1060 (C=O); 1447 e 1520 (NO ₂)	211-213	a)	84
4b	1656 (C=O); 1356 e 1474 (NO ₂)	255-256	a)	73

a) Não descrito.

O espectro de RMN de ¹H relativo às 5-(benzisoxazol-3-ilideno)pirimidinas **4a-b** apresentam todos os sinais esperados (tabelas 3.5 e 3.6). De destacar que por análise do espectro de RMN de ¹H, verifica-se que a 5-(benzisoxazol-3-ilideno)pirimidina **4a** apresenta simetria, uma vez que o sinal a 3,62 ppm integra para 6 prótons dos grupos metilos. Essa simetria é também comprovada

pelo espectro de RMN de ^{13}C , uma vez que apresenta um sinal a 159,21 ppm correspondente aos carbonilos dos carbonos 4 e 6.

Tabela 3.5 - RMN de ^1H das 5-(benzisoxazol-3-ilideno)pirimidinas **4a-b**, em $\text{DMSO}-d_6$.

Composto	4'-ArCH J em Hz	7'-ArCH J em Hz	6'-ArCH J em Hz	5'-ArCH J em Hz	Outros sinais J em Hz
4a	7,77 (dt, 1H, J = 8,8 e 1,1 Hz)	7,38 (dt, 1H, J = 9,0 e 1,0 Hz)	7,24 (ddd, 1H, J = 9,0, 6,3 e 1,1 Hz)	6,77 (ddd, 1H, J = 8,8, 6,6 e 0,9 Hz)	3,62 (s, 6H, 1-, 3-NCH ₃)
4b	7,83 (d, 1H, J = 8,8 Hz)	a)	7,21 (dd, 1H, J = 8,6 e 6,3 Hz)	6,70 (dd, 1H, J = 8,8 e 6,2 Hz)	4,42 (dd, 4H, J = 8,3 e 6,9 Hz, 3'', 5''-ArCH); 7,36-7,26 (m, 7H, 7'', 2'', 4'', 6''-ArCH)
a)	Indefinido				

Tabela 3.6 - RMN de ^{13}C das 5-(benzisoxazol-3-ilideno)pirimidinas **4a-b**, em $\text{DMSO}-d_6$.

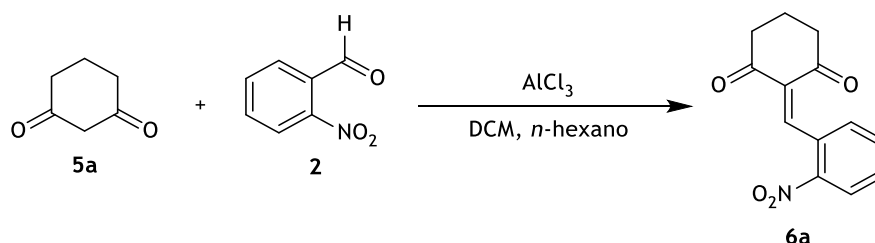
Composto	3'-C	4- e 6-C=O	7a'-ArC	6'-ArCH	4'-ArCH	5'-ArCH	3a'-C	7'-ArCH	5-C	Outros sinais
4a	166,53	159,21	156,19	130,42	125,06	119,77	114,78	113,32	84,69	177,12 (2-C=S); 34,86 (1,3-NCH ₃)
4b	167,79	161,23	156,52	130,81	126,01	119,43	114,49	113,30	82,33	152,17 (2-CO); 137,84 (1''-ArC); 130,13 (2'', 6''-ArCH); 128,79 (3'', 5'' ArCH); 127,60 (4''-ArCH)

3.1.3. 2-Nitrobenzilidenos derivados de 1,3-dicarbonilos cíclicos 6a-k

A síntese dos derivados de 2-nitrobenzilidenos **6a-b** abaixo apresentados teve como objetivo inicial a sua utilização como precursores na síntese de 5-(benzisoxazol-3-ilideno)pirimidinas, com o intuito de generalizar este método para outros núcleos que não barbituratos, como descrito na literatura.⁶⁶ Contudo, após diversas tentativas, essa transformação não se observou verificando-se a formação não esperada de *N*-óxidos de quinolina cujo os resultados serão apresentados na subsecção 3.1.5. Neste contexto, a síntese dos derivados de 2-nitrobenzaldeídos, tiveram como segundo objetivo a formação e desenvolvimento de outras vias sintéticas para a preparação de *N*-óxidos de quinolina. A preparação destes derivados envolve uma reação do tipo Knoevenagel entre um 1,3-dicarbonilo **5a-j** e o 2-nitrobenzaldeído (**2**).

3.1.3.1. 2-(2'-Nitrobenzilideno)ciclohexan-1,3-diona (**6a**)

A preparação da 2-(2'-nitrobenzilideno)ciclohexan-1,3-diona (**6a**), envolve uma condensação entre a ciclohexan-1,3-diona (**5a**) e o 2-nitrobenzaldeído (**2**) (esquema 3.3). Esta síntese foi realizada com adaptação ao método descrito por Zheng-Nan Li *et al.*,⁶⁷ utilizando-se uma mistura de solventes (DCM/*n*-hexano (3:5)). Apesar do tempo reacional ser demorado, o isolamento é rápido e simples, uma vez que o produto precipita ao longo da sua formação, obtendo -se um elevado rendimento (tabela 3.7).



Esquema 3.3 - Síntese da 2-(2'-nitrobenzilideno)ciclohexan-1,3-diona (**6a**).

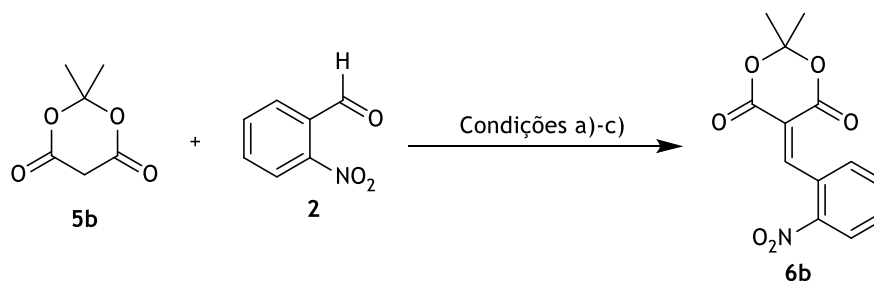
Relativamente ao intervalo de fusão obtido para **6a**, este é estreito o que indica que as possíveis impurezas presentes não são relevantes (tabela 3.7). Analisando o espectro de FTIR, verifica-se as bandas correspondentes aos grupos funcionais principais, nomeadamente à ligação C=O a 1663 cm^{-1} , associada às vibrações de deformação axial e duas bandas fortes de deformação axial assimétrica e simétrica a 1516 e 1334 cm^{-1} respetivamente, responsáveis pelo grupo NO_2 . (tabela 3.7).

Tabela 3.7 - Bandas caraterísticas dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para **6a**.

Composto	FTIR (bandas caraterísticas em cm ⁻¹)	Ponto de fusão (°C)	Literatura (°C)	η (%)
6a	1663 (C=O); 1516 e 1334 (NO ₂)	149-150	204-206 ⁶⁸	93

3.1.3.2. 2,2-Dimetil-5-(2-nitrobenzilideno)-1,3-dioxan-4,6-diona (**6b**)

A síntese da 2,2-dimetil-5-(2-nitrobenzilideno)-1,3-dioxan-4,6-diona (**6b**) a partir da 2,2-dimetil-1,3-dioxan-4,6-diona (**5b**) e do 2-nitrobenzaldeído (**2**) realizou-se com base em três condições reacionais diferentes (esquema 3.4).



Esquema 3.4 - Síntese da 2,2-dimetil-5-(2-nitrobenzilideno)-1,3-dioxan-4,6-diona (**6b**). Condições reacionais: a) H₂O/ Δ; b) MeOH/ peneiros moleculares/Δ; c) AlCl₃ (0,2) / DCM, *n*-hexano/ t.a.

Relativamente à condição reacional a), esta foi realizada na presença de água,⁶⁶ na qual se obteve um rendimento de 38% (tabela 3.8). Na tentativa de otimizar o rendimento obtido, tentou-se a síntese de **6b**, recorrendo a um método simples, descrito por Sandhu *et al.*,⁶⁹ (condição reacional b)). Este método permitiu a formação do produto pretendido apresentando um rendimento moderado (tabela 3.8). Com a expectativa de otimizar ainda mais o rendimento, utilizou-se o método descrito (condição reacional c)), descrito por Zheng-Nan Li *et al.*,⁶⁷ no qual se obteve um bom rendimento (tabela 3.8). Apesar do tempo reacional que este apresenta, o rendimento obtido justifica a utilização deste método em detrimento dos outros realizados com tempos mais curtos.

Tabela 3.8 - Condições reacionais: a) H₂O/ Δ ; b) MeOH/ peneiros moleculares/ Δ ; c) AlCl₃ (0,2 eq.)/ DCM, *n*-hexano/ t.a. e rendimentos obtidos para a síntese de 2,2-dimetil-5-(2-nitrobenzilideno) -1,3-dioxan-4,6-diona (**6b**).

Condições reacionais	Tempo	η (%)
a)	8 horas	38
b)	3 horas	51
c)	8 dias	77

Para a preparação dos derivados 2-nitrobenzilidenos **6**, a condição reacional a) para a obtenção de **6b**, e no caso da preparação de **6a**, a condição reacional c), envolve um isolamento simples em que o produto precipita ao longo da sua formação sendo posteriormente filtrado e lavado com *n*-hexano. Contudo, é de realçar que são necessárias várias lavagens sucessivas com *n*-hexano para a obtenção do produto pretendido, caso contrário o produto obtido apresenta-se com quantidades residuais de 2-nitrobenzaldeído (**2**).

Tabela 3.9 - Bandas caraterísticas dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para o composto **6b**.

Composto	FTIR (bandas caraterísticas em cm ⁻¹)	Ponto de fusão (°C)	Literatura (°C)	η (%)
6b	1740 e 1729 (C=O); 1512 e 1336 (NO ₂)	105-106	116-118 ⁶⁹	77

O intervalo de fusão obtido encontra-se ligeiramente abaixo do intervalo de fusão descrito na literatura, contudo, o intervalo obtido é estreito revelando que as possíveis impurezas existentes têm pouca significância (tabela 3.9).

O espectro de FTIR de **6b** apresenta as bandas caraterísticas dos grupos principais, destacando-se a ligação C=O a 1690 cm⁻¹ associada às vibrações de deformação axial e duas bandas fortes de deformação axial assimétrica e simétrica a 1518 e 1340 cm⁻¹ respetivamente, responsáveis pelo grupo NO₂ (tabela 3.9).

Da análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C (tabelas 3.10 e 3.11), pode-se observar que estes compostos apresentam sinais característicos, essencialmente na zona aromática. É também de destacar que estes 2-nitrobenzilidenos cíclicos **6** apresentam um sinal característico no espectro de RMN de ¹H, o singuleto a 8,17 e 8,85 ppm para **6a** e **6b**, respetivamente (tabela 3.10). Através da análise do espectro de RMN de ¹³C, verifica-se que para os compostos **6a** e **6b**, é apresentado a 146,87 e 156,18 ppm respetivamente, o sinal correspondente ao carbono 5 (tabela 3.11).

Tabela 3.10 - RMN de ^1H da 2-(2'-nitrobenzilideno)ciclohexan-1,3-diona (**6a**) e da 2,2-dimetil-5-(2-nitrobenzilideno) -1,3-dioxan-4,6-diona (**6b**), em $\text{DMSO}-d_6$.

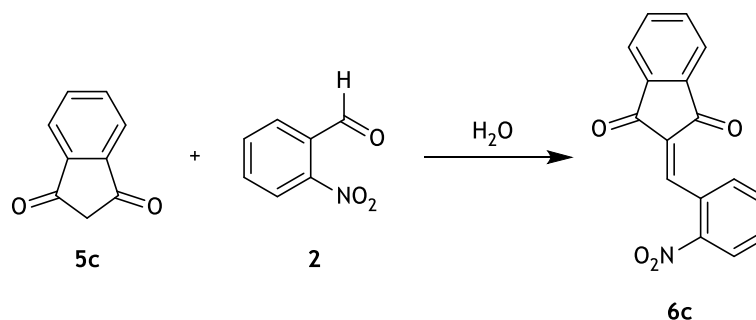
Compostos	2-CCH e 5-CCH	3'-ArCH J em Hz	5'-ArCH J em Hz	4' -ArCH J em Hz	6' -ArCH J em Hz
6a	8,17 (s, 1H)	8,21 (d, 1H, J = 8,2 Hz)	7,74 (t, 1H, J = 7,6 Hz)	7,64 (t, 1H, J = 7,8 Hz)	7,44 (d, 1H, J = 7,7 Hz)
6b	8,85 (s, 1H)	8,28 (d, 1H, J = 8,3 Hz)	7,85 (t, 1H, J = 7,5 Hz)	7,74 (t, 1H, J = 7,8 Hz)	7,62 (d, 1H, J = 7,6 Hz)

Tabela 3.11 - RMN de ^{13}C da 2-(2'-nitrobenzilideno)ciclohexan-1,3-diona (**6a**) e da 2,2-dimetil-5-(2-nitrobenzilideno) -1,3-dioxan-4,6-diona (**6b**), em $\text{DMSO}-d_6$.

Composto	5-CCH	2'-ArC	5'-ArCH	1'-ArC	4'-ArCH	6'-ArCH	3'-ArCH
6a	146,87	146,76	133,95	132,74	130,12	129,77	124,23
6b	156,18	146,34	134,25	131,01	130,38	130,34	124,43

3.1.3.3. 2-(2-Nitrobenzilideno)-1H-inden-1,3(2H)-diona (**6c**)

A preparação da 2-(2nitrobenzilideno)-1H-inden-1,3(2H)-diona (**6f**), envolve uma reação de condensação entre a indandiona (**5b**) e o 2-nitrobenzaldeído (**2**), na presença de água (esquema 3.5). Uma vez que, o produto precipita ao longo da sua formação o seu isolamento é simples e rápido, obtendo-se o produto pretendido. Este método foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Yang *et al.*,⁷⁰ obtendo-se um bom rendimento (tabela 3.12).



Esquema 3.5 - Síntese da 2-(2nitrobenzilideno)-1H-inden-1,3(2H)-diona (**6c**).

Relativamente ao intervalo de fusão obtido, este encontra-se afastado do intervalo de fusão teórico, contudo, e uma vez que este intervalo é estreito, poderá indicar que as impurezas presentes não sejam significantes.

O espectro de FTIR apresenta as bandas características dos grupos principais nomeadamente, a ligação $\text{C}=\text{O}$ associada às vibrações de deformação axial a 1690 cm^{-1} e duas bandas fortes de

deformação axial assimétrica e simétrica a 1518 e 1340 cm^{-1} correspondentes ao grupo NO_2 (tabela 3.12).

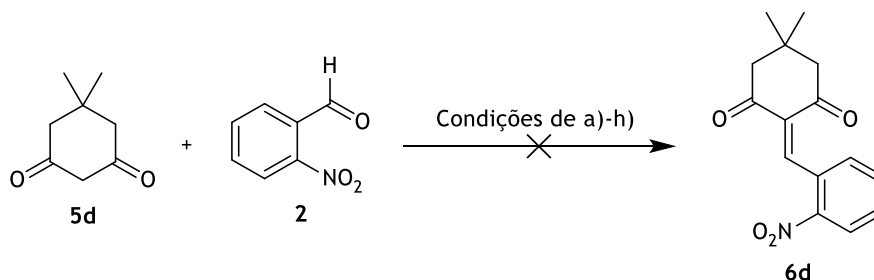
Após a análise do espectro de RMN de ^1H , verifica-se a presença de todos os sinais correspondentes aos prótons, estando estes de acordo com a literatura, destacando-se um singuleto a 8,24 ppm, característico destes derivados.⁷⁰

Tabela 3.12 - Bandas caraterísticas dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para a 2-(2-nitrobenzilideno)-1*H*-inden-1,3(2*H*)-diona (**6c**).

Composto	FTIR (bandas caraterísticas em cm^{-1})	Ponto de fusão ($^{\circ}\text{C}$)	Literatura ($^{\circ}\text{C}$)	η (%)
6c	1690 (C=O); 1518 e 1340 (NO_2)	178-179	192-194 ⁷⁰	77

3.1.3.4. Tentativas para a síntese de 5,5-dimetil-2-(2-nitrobenzilideno)ciclohexan-1,3-diona (**6d**)

Para a obtenção do 5,5-dimetil-2-(2-nitrobenzilideno)ciclohexan-1,3-diona (**6d**), e à semelhança dos 2-nitrobenzilidenos acima descritos, utilizou-se água para a introdução do grupo 2-nitrobenzaldeído na posição 3 do anel cíclico (condição reacional a)). Contudo, tal transformação não se verificou (esquema 3.6).



Esquema 3.6 - Tentativa de síntese da 5,5-dimetil-2-(2-nitrobenzilideno)ciclohexan-1,3-dionea (**6d**). Condições reacionais: a) $\text{H}_2\text{O}/\text{t.a.}$; b) $\text{H}_2\text{O}/\text{t.a.}$; c) $\text{H}_2\text{O}/\text{t.a}/80^{\circ}\text{C}$; d) KOH (1 eq.)/ EtOH ; e) AlCl_3 (0,2 eq.), DCM , *n*-hexano/ t.a. ; f) trietilamina (Et_3N)/ AlCl_3 (0,2 eq.)/ DCM /*n*-hexano/ t.a. ; g) piperidina (0,1 eq.)/ CH_3COOH (0,2 eq.)/ benzeno ; h) metóxido de sódio/ t.a.

Na tentativa de obtenção do 5,5-dimetil-2-(2-nitrobenzilideno)ciclohexan-1,3-diona (**6d**), vários métodos foram realizados tendo por base a condição reacional a). Desta forma, as condições reacionais b) e c) foram adaptadas da condição reacional a), aumentando o tempo de reação como também a temperatura, no caso da condição c) (tabela 3.13).

Tabela 3.13 - Tentativa de síntese de 5,5-dimetil-2-(2-nitrobenzilideno)ciclohexan-1,3-diona (**6d**). Condições reacionais: a) H₂O/t.a.; b) H₂O/t.a.; c) H₂O/t.a/80°C; d) KOH (1 eq.)/ EtOH; e) AlCl₃ (0,2 eq.), DCM, *n*-hexano/ t.a; f) trietilamina (Et₃N)/ AlCl₃ (0,2 eq.)/ DCM/ *n*-hexano/ t.a; g) piperidina (0,1 eq.)/ CH₃COOH (0,2 eq.)/ benzeno; h) metóxido de sódio/ t.a.

Material de partida		Condições reacionais	Tempo
5c	2		
1 eq.	1 eq.	a)	3 horas
1 eq.	2 eq.	b)	2 dias
1 eq.	1,1 eq.	c)	4 dias
1 eq.	1 eq.	d)	4 horas
1 eq.	2 eq.	e)	6 dias
1 eq.	2 eq.	f)	4 dias
1 eq.	1 eq.	g)	19 horas
1 eq.	2 eq.	h)	18 horas

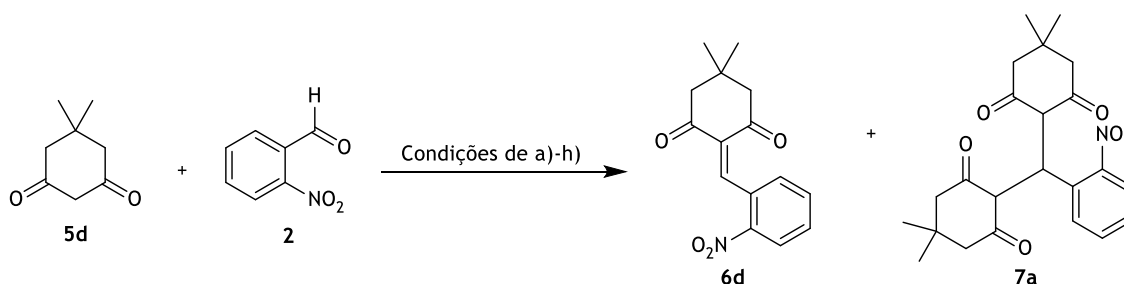
Apesar de reportado por Martínez *et al.*,⁷¹ a formação de 5,5-dimetil-2-(2-nitrobenzilideno)ciclohexan-1,3-diona (**6d**), na presença de hidróxido de potássio em etanol (condição reacional d)), não se verificou.

Para obtenção deste 2-nitrobenzilideno **6d**, foi ainda utilizado o mesmo método (condição reacional e) para a obtenção de **6a-b** embora igualmente sem sucesso.

Comprovando-se o insucesso das reações anteriores, planeou-se o uso de trietilamina (Et₃N) e metóxido de sódio (condições reacionais f) e h), respetivamente - esquema 3.6) para a síntese de 2-nitrobenzaldeído **6d**. As bases Et₃N e o metóxido de sódio catalisam a condensação via enolato mas, no entanto, estas alternativas não se mostraram igualmente bem-sucedidas (condições f) e h) respetivamente). Relativamente a condição reacional g), foi realizada de acordo com o descrito por Zaytsev *et al.*,⁷² tendo em conta que esta condição permite a formação de 2-nitrobenzilidenos (acíclicos). No entanto, a formação de **6d** não foi novamente conseguida.

Analisando os produtos obtidos nas condições acima apresentadas, verifica-se por RMN de ¹H e por ccf, que se obtêm sempre dois produtos (esquema 3.7), com exceção da condição h), na qual se verificou uma mistura complexa, não sendo possível identificar por RMN de ¹H.

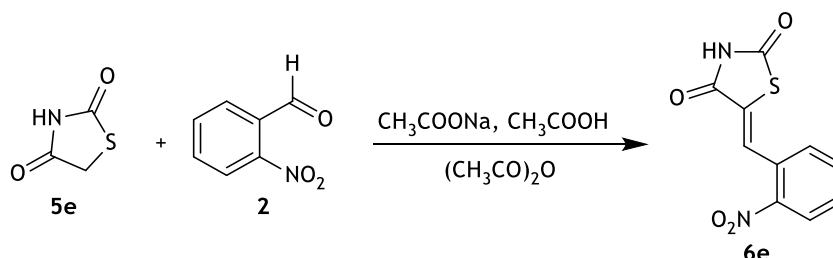
Através do espectro de RMN de ^1H , verifica-se uma razão de 45/55 para o 2-nitrobenzilidenos **6d** e para o 2-nitrofenilmetileno **7a**, respetivamente, não tendo sido possível o seu isolamento (esquema 3.7).



Esquema 3.7 - Tentativa de síntese de 5,5-dimetil-2-(2-nitrobenzilideno)ciclohexan-1,3-diona (**6d**).

3.1.3.5. 5-(2-Nitrobenzilideno)tiazolidina-2,4-diona (**6e**)

A preparação de 5-benzilidenetiazolidina-2,4-diona (**6e**), envolve uma condensação entre tiazolidina-2,4-diona (**5e**) e o 2-nitrobenzaldeído (**2**), na presença de acetato de sódio, ácido acético e anidrido acético (esquema 3.8). Este procedimento foi uma adaptação ao descrito por Tănăsescu *et al.*,⁷³ aumentando o tempo reacional, e adicionalmente por tratamento com carvão ativado para remover impurezas coradas. Após esse tratamento, obtém-se o produto pretendido e com um rendimento moderado (tabela 3.14).



Esquema 3.8 - Síntese da 5-(2-nitrobenzilideno) tiazolidin-2,4-diona (**6e**).

O espectro de FTIR apresenta as bandas tipicamente esperadas, nomeadamente a 3359 cm^{-1} característica da ligação N-H, duas bandas a 1735 e 1713 cm^{-1} correspondentes da ligação C=O e também duas bandas a 1518 e 1314 cm^{-1} representativas do grupo NO_2 (tabela 3.14).

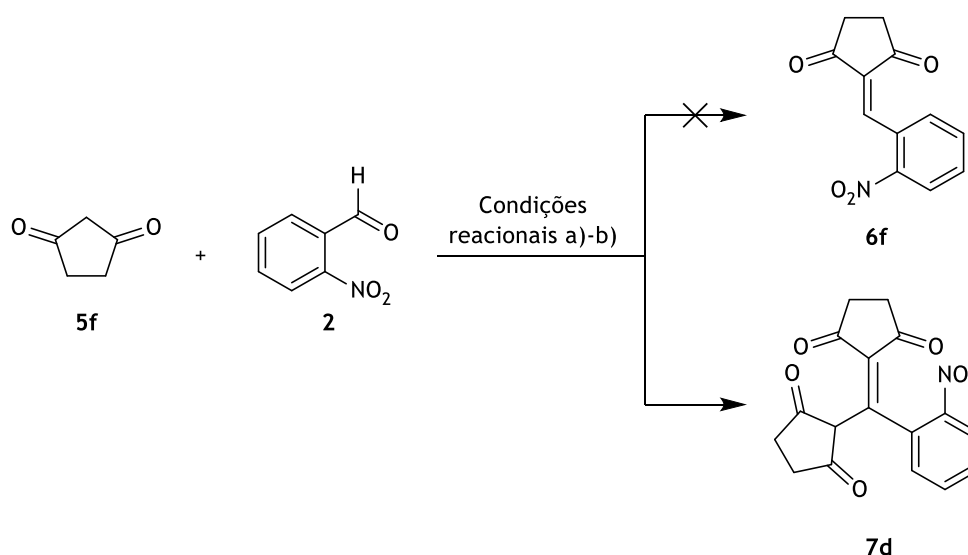
Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C apresentam todos os sinais, estando de acordo com o descrito na literatura.⁷⁴ Assim, pela análise do espectro de RMN de ^1H , verifica-se um singuleto a $12,77\text{ ppm}$ correspondente a ligação N-H e um singuleto a $7,97\text{ ppm}$ característico destes derivados 2-nitrobenzilidenos **6**.

Tabela 3.14 - Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para a 5-(2-nitrobenzilideno) tiazolidin-2,4-diona (**6e**).

Composto	FTIR (bandas características em cm ⁻¹)	Ponto de fusão (°C)	Literatura (°C)	η (%)
6e	3358 (N-H); 1735 e 1713 (C=O); 1518 e 1314 (NO ₂)	190-191	195-196 ⁷³	52

3.1.3.6. Tentativas de síntese para a 2-(2-nitrobenzilideno)ciclopentan-1,3-diona (**6f**)

Para a síntese da 2-(2-nitrobenzilideno)ciclopentan-1,3-diona (**6f**), a partir da ciclopentan-1,3-diona (**5f**) e do 2-nitrobenzaldeído (**2**), realizaram-se duas condições reacionais diferentes, contudo sem sucesso (esquema 3.9).



Esquema 3.9 - Tentativas de síntese para a 2-(2-nitrobenzilideno)ciclopentan-1,3-diona (**6f**). Condições reacionais: a) H₂O/t.a./Δ; b) AlCl₃/DCM/*n*-hexano/t.a.

Tabela 3.15 - Tentativas de síntese para a 2-(2-nitrobenzilideno)ciclopentan-1,3-diona (**6f**). Condições reacionais: a) H₂O/t.a./Δ; b) AlCl₃/DCM/*n*-hexano/t.a.

Material de partida		Condições reacionais	Tempo	η (%)
5f	2			
1 eq.	1,1 eq.	a)	19 horas	a)
1 eq.	2 eq.	b)	1 dias	53

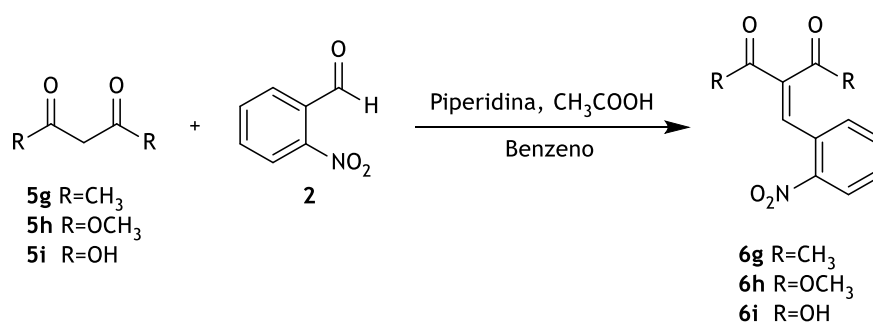
a) Formação de **6f** com quantidades residuais de 2-nitrobenzaldeído.

As condições reacionais realizadas para a preparação de **6f** não representaram o sucesso pretendido, contudo houve formação inesperada de **7d**, que será discutido posteriormente na subsecção 3.1.4, dos derivados de 2-nitrofenilmetilenos **7**.

3.1.3.7. 2-Nitrobenzilidenos acíclicos **6g-6i**

A preparação de 2-nitrobenzilidenos acíclicos **6g-6i**, envolve uma reação do tipo Knoevenagel entre os 1,3-dicarbonilos correspondentes **5g-5i** e o 2-nitrobenzaldeído (**2**), na presença de piperidina, ácido acético e benzeno, de acordo com o método descrito por Zaytsev *et al.*⁷²

A síntese de **6g-6i**, foi realizada de acordo com o método acima referido. Apesar de serem necessárias várias lavagens e extrações, este método permitiu a obtenção do produto pretendido, obtendo-se rendimentos bons a excelentes (tabela 3.16).



Esquema 3.10 - Síntese dos 2-nitrobenzilidenos acíclicos **6g-6i**.

Tabela 3.16 - Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para os **6g-6i**.

Composto	FTIR (bandas características em cm ⁻¹)	Ponto de fusão (°C)	Literatura (°C)	η (%)
6g	1667 (C=O); 1520 e 1342 (NO ₂)	-	a)	83
6h	1717 (C=O); 1519 e 1340 (NO ₂); 1223 (C-O)	-	a)	97
6i	3400 a 2000 (O-H); 1686 (C=O); 1519 e 1249 (NO ₂)	140-141	151-154 ⁷⁵	91

a) Não descrito.

No espectro de FTIR, são observadas as bandas características, nomeadamente a ligação C=O a 1667, 1717 e 1686 cm⁻¹ associada às vibrações de deformação axial para **6g**, **6h** e **6i**, respetivamente, duas bandas fortes de deformação axial correspondentes ao grupo NO₂ a 1520,

1519, 1519 e 1342, 1340 e 1249 para **6g**, **6h** e **6i**, respectivamente. É de realçar, a presença de uma banda forte e larga entre 3400 e 2000 cm^{-1} , característica do grupo O-H para **6i** (tabela 3.16).

Relativamente ao intervalo de fusão obtido para **6i** não se encontrar dentro do intervalo de fusão descrito na literatura, é importante destacar que o intervalo obtido é estreito e desta forma permite inferir que as impurezas que possam estar presentes não são significativas (tabela 3.16).

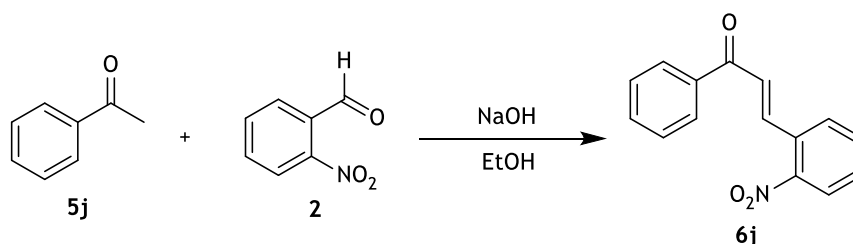
Relativamente à preparação do 2-nitrobenzilideno **6i**, este também se tentou preparar utilizando como solvente a água. Contudo, mesmo após 6 horas de reação não se verificou a formação de produto pretendido. Este método foi realizado utilizando o procedimento para a obtenção dos 2-nitrobenzilidenos cíclicos anteriormente descritos.

Os espectros de ^1H e de ^{13}C apresentam os sinais esperados. Através da análise do espectro de RMN de ^1H , destaca-se para **6g** e **6i** o singuleto a 7,91 e 7,94 ppm respectivamente, característico destes derivados 2-nitrobenzilidenos de 1,3 dicarbonilos acíclicos (tabela - 3.17). Os sinais relativos a **6i**, apresentam-se com um desvio químico mais afastado de **6g** e **6i**, uma vez que o espectro desse foi realizado em $\text{DMSO}-d_6$ e os restantes foram realizados em CDCl_3-d .

Tabela 3.17 - RMN de ^1H dos compostos **6g** e **6h** ($\text{DMSO}-d_6$) e **6i** (CDCl_3-d).

Compostos	ArCH J em Hz	3-CCH 2-CCH J em Hz	ArCH J em Hz	ArCH J em Hz	ArCH J em Hz
6g	8,23 (dd, 1H, J = 8,1, 1,4 Hz)	7,91 (s, 1H)	7,66 (td, 1H, J = 7,5 e 1,4 Hz)	7,59 (dddd, 1H, J = 8,1, 7,5, 1,5, 0,6 Hz)	7,39 (dt, 1H, J = 7,5, 1,2 Hz)
6h	8,22 (dt, 2H, J = 4,4, 3,8, 1,4)		7,65 (td, 1H, J = 7,6 e 1,4 Hz)	7,57 (dddd, 1H, J = 8,2, 7,4, 1,6, 0,6 Hz)	7,41 (dt, 1H, J = 7,6, 1,3 Hz)
6i	8,19 (dd, 1H, J = 8,3 e 1,2 Hz)	7,94 (s, 1H)	7,81 (td, 1H, J = 7,6 e 1,3 Hz)	7,67 (td, 1H, J = 7,8 e 1,5 Hz)	7,52 (dt, 1H, J = 7,7, 1,1 Hz)

A preparação da (E)-3-(2-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**6j**) envolve também uma reação do tipo Knoevenagel entre a acetofenona (**5j**) e o 2-nitrobenzaldeído (**2**) em água à temperatura ambiente (esquema 3.11). A síntese foi baseada no método descrito por Hu Zhongyan *et al.*,⁷⁶ procedendo a uma adaptação no tempo reacional, aumentando-o. Posteriormente, e adicionando-se ácido sulfúrico, a mistura reacional é aquecida num banho a 80 °C e o produto precipita ao longo da sua formação o que permite um isolamento fácil e rápido, obtendo-se o produto na forma de cristais com um rendimento moderado (tabela 3.18).



Esquema 3.11- Síntese da (E)-3-(2-nitrofenil) -1-fenilprop-2-en-1-ona (**6j**).

O intervalo de fusão obtido encontra-se muito próximo do descrito na literatura e, uma vez que esse é estreito, indica que as impurezas que possam estar presentes não são significativas (tabela 3.18).

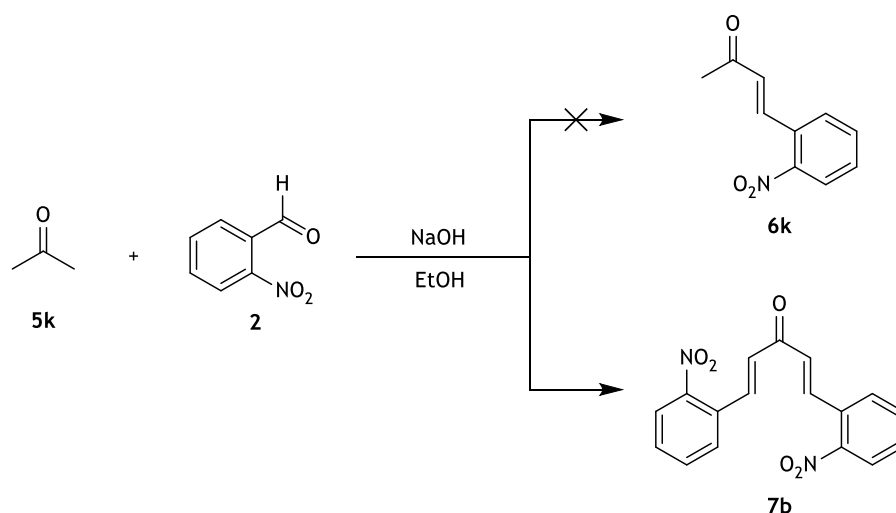
No espectro de FTIR, são apresentadas as bandas características e esperadas, nomeadamente a banda correspondente à ligação C=O associada às vibrações de deformação axial a 1603 cm⁻¹ e duas bandas fortes a 1509 e 1338 cm⁻¹ associadas às vibrações de deformação axial assimétrica e simétrica, respetivamente, responsáveis pelo grupo NO₂ (tabela 3.18).

Tabela 3.18 - Bandas caraterísticas dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para os **6j**.

Composto	FTIR (bandas caraterísticas em cm ⁻¹)	Ponto de fusão (°C)	Literatura (°C)	η (%)
6j	1603 (C=O); 1509 e 1338 (NO ₂)	118-119	120-122 ⁷⁷	54

Os sinais de ¹H obtidos, estão de acordo com a literatura, sendo importante realçar que no espectro foram obtidos dois dupletos, a um desvio químico de 8,00 e 7,91 ppm, com uma constante de acoplamento de 15,5 Hz que indica que a molécula esteja na conformação *trans* (isomeria *E*), como seria de esperar nos compostos com estas características. Relativamente aos sinais de ¹³C, foram obtidos 13 sinais para os 15 carbonos totais o que está de acordo com a simetria da molécula dos carbonos provenientes da acetofenona.

O método descrito por Hu Zhongyan *et al.*,⁷⁶ foi também utilizado para a reação entre a acetona (**5k**) e o 2-nitrobenzaldeído (**2**) com o objetivo de sintetizar o 2-nitrobenzilideno acíclico **7b** correspondente (esquema 3.12).



Esquema 3.12 - Tentativa de síntese da (*E*)-4-(2-nitrofenil)but-3-en-2-ona (**6k**), com obtenção de **7b**.

Através do método acima descrito não se verificou a formação do produto pretendido, verificando-se uma dupla adição do grupo 2-nitrobenzaldeído e, conseqüentemente, a formação do 2-nitrofenilmetileno **7b** com um bom rendimento (tabela 3.19).

Da análise do espectro de FTIR, verifica-se a presença de bandas características para os grupos funcionais importantes, nomeadamente a banda a 1621 cm^{-1} correspondente a ligação C=O associada às vibrações de deformação axial e duas bandas fortes associadas às vibrações de deformação axial assimétrica e simétrica 1507 e 1337 cm^{-1} respetivamente, responsáveis pelo grupo NO_2 (tabela 3.19).

Relativamente ao intervalo de fusão verifica-se que este é estreito, e desta forma, pode-se inferir que as impurezas que possam estar presentes não são significativas (tabela 3.19).

Tabela 3.19 - Bandas caraterísticas dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para **7b**.

Composto	FTIR (bandas caraterísticas em cm^{-1})	Ponto de fusão ($^{\circ}\text{C}$)	Literatura ($^{\circ}\text{C}$)	η (%)
7b	1621 (C=O); 1507 e 1337(NO_2)	170,5-171	a)	86

a) Não descrito.

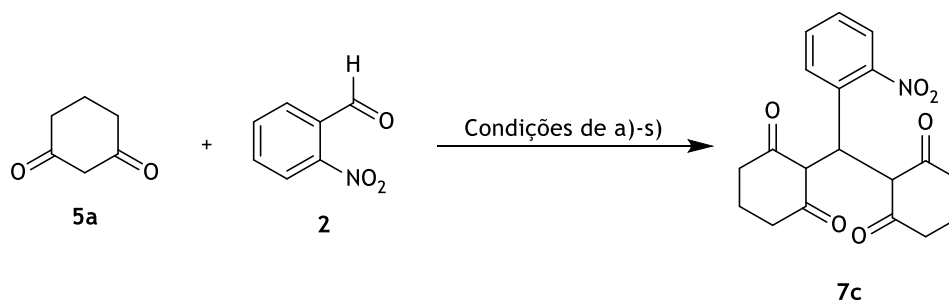
Através dos sinais obtidos pelo espectro de ^1H pode-se concluir que a molécula está na conformação *trans* (isomeria *E*), uma vez que foram obtidos dois sinais correspondentes a dois dupletos (d), a um desvio químico de 8,05 e 7,30 ppm, com uma constante de acoplamento de 15,9 e 15,8 Hz, respetivamente. No espectro de ^{13}C , foram obtidos 9 sinais para os 17 carbonos, devido à simetria que a molécula apresenta.

3.1.4. 2-Nitrofenilmetilenos derivados de 1,3-dicarbonilos 7

Nesta subsecção, serão apresentadas as sínteses e tentativas de síntese realizadas para a obtenção dos derivados de 2-nitrofenilmetilenos 7.

Aquando da formação do derivado de 2-nitrobenzilideno 6a, observou-se a formação inesperada do 2,2'-((2-nitrofenil)metileno)bis(ciclohexan-1,3-diona) (7c). A formação de 7c é devida a uma dupla adição da ciclohexan-1,3-diona (5a), podendo ser explicada pela reação de adição de Michael.

Seguidamente serão apresentadas as diferentes tentativas para a obtenção do derivado 7c ao invés da formação de 6a como inicialmente se pretendia.



Esquema 3.13 - Síntese da 2,2'-((2-nitrofenil)metileno)bis(ciclohexan-1,3-diona) (7c). Condições reacionais: a) H₂O/ Δ ; b) H₂O/t.a.; c) MeOH/ Δ ; d) MeOH, peneiros moleculares (PM)/t.a.; e) MeOH, PM/ Δ ; f) éter etílico seco, PM/ t.a.; g) éter etílico seco, PM/HCl 5%/ t.a.; h) éter etílico seco, PM/Et₃N/t.a.; i) prolina/t.a.; j) BiCl₃/ Δ ; k) AlCl₃/MeOH, PM/ Δ ; l) AlCl₃/MeOH, PM/ Δ ; m) AlCl₃/EtOAc seco/t.a.; n) AlCl₃/tolueno/t.a.; o) AlCl₃/tolueno/ Δ ; p) EtOH/ Δ ; q) CH₃COOH/ Δ ; r) benzeno seco/ Δ ; s) fusão.

As condições abaixo descritas (tabela 3.20), foram testadas para obtenção de 6a verificando-se invariavelmente a formação de 7c. Neste contexto, foram obtidas várias condições reacionais para a preparação do 2-nitrofeniltetileno 7c, uma vez que se tentou sempre otimizar o processo de forma a preparar o derivado 2-nitrobenzilideno cíclico 6a.

Tabela 3.20 - Síntese da 2,2'-((2-nitrofenil)metileno)bis(ciclohexan-1,3-diona) (**7c**). Condições reacionais: a) H₂O/ Δ ; b) H₂O/t.a.; c) MeOH/ Δ ; d) MeOH, peneiros moleculares (PM)/t.a.; e) MeOH, PM/ Δ ; f) éter etílico seco, PM/ t.a.; g) éter etílico seco, PM/HCl 5%/ t.a.; h) éter etílico seco, PM/Et₃N/ t.a.; i) prolina/t.a.; j) BiCl₃/ Δ ; k) AlCl₃/MeOH, PM/ Δ ; l) AlCl₃/MeOH, PM/ Δ ; m) AlCl₃/EtOAc seco/t.a.; n) AlCl₃/tolueno/t.a.; o) AlCl₃/tolueno/ Δ ; p) EtOH/ Δ ; q) CH₃COOH/ Δ ; r) benzeno seco/ Δ ; s) fusão.

Material de partida		Condições reacionais	Tempo	η (%)
5a	2			
1 eq.	1 eq.	a)	6 horas	89
1 eq.	1 eq.	b)	6 horas	a)
1 eq.	1 eq.	c)	2 horas	68
1 eq.	1 eq.	d)	20 horas	83 b)
1 eq.	1 eq.	e)	3 hora	49
1 eq.	1 eq.	f)	4 dias	85 b)
1 eq.	1 eq.	g)	1 dia	-
1 eq.	1 eq.	h)	1 dia	85 b)
1,1 eq.	1 eq.	i)	10 min.	b)
1 eq.	1 eq.	j)	19 horas	b)
1 eq.	1 eq.	k)	5 horas e 30 min.	c)
1 eq.	1 eq.	l)	1 dia	b)
1 eq.	1 eq.	m)	1 dia	b)
1 eq.	1 eq.	n)	1 dia	b)
1 eq.	1 eq.	o)	1 dia	a)
2 eq.	1 eq.	p)	6 dias	70
1 eq.	1 eq.	q)	5 horas	b)
1 eq.	1 eq.	r)	5 horas	b)
1 eq.	1 eq.	s)	10 min.	b)

a) Não há formação de produto; b) Formação de **7c** com quantidades residuais de 2-nitrobenzaldeído; c) Formação de uma mistura de **6a** e **7c**.

Desta forma, como referido anteriormente, e uma vez que ocorria sempre a formação de **7c**, seguidamente serão apresentadas todas as condições reacionais utilizadas para a sua síntese.

Inicialmente, utilizou-se um método descrito na literatura⁶⁶ (condição reacional a), que permitiu a formação do produto **7c** com bom rendimento (tabela 3.20). Por outro lado, e de forma a perceber se a temperatura influenciava na reação, utilizou-se água como solvente mas à temperatura ambiente (condição reacional b)). Assim, após algum tempo de reação verificou-se que não se formava qualquer produto. Numa terceira tentativa, utilizou-se metanol e a mistura foi colocada em refluxo (condição reacional c)), sendo este método escolhido com base na síntese de **6b** (tabela 3.20). Posteriormente, e na tentativa de entender se a temperatura influenciava a reação, realizaram-se dois métodos em metanol, à temperatura ambiente e em refluxo (condição reacional d) e e), respetivamente), e na presença de peneiros moleculares previamente ativados, tal como descrito por Sandhu *et al.*,⁶⁹ para a obtenção de **6b**. Analisando as duas condições referidas anteriormente, ambas permitem a formação de **7c**, sendo que na condição reacional d) obtêm-se o produto, com uma quantidade residual de 2-nitrobenzaldeído (**2**).

Seguidamente, planeou-se a utilização de um solvente aprótico, o éter etílico sendo previamente seco e na presença de peneiros moleculares (condição reacional f)). A reação foi continuamente acompanhada e ao fim de quatro dias obteve-se novamente o derivado de 2-nitrofenilmetileno **7c**. Continuamente, manteve-se o solvente utilizado na condição reacional f), e numa outra condição reacional utilizou-se ácido clorídrico a 5%, enquanto que noutra utilizou-se a trietilamina (um equivalente), de forma a perceber se a síntese era influenciada pela catálise ácida ou básica (condições reacionais g) e h), respetivamente). Outras vias sintéticas, foram realizadas com condições reacionais dispares, nomeadamente a utilização de prolina (condição reacional i)) e de cloreto de bismuto (III), uma vez que este é um catalisador importante em reações do tipo de Knoevenagel.⁷⁸ Recorreu-se a outras condições reacionais, nas quais foi utilizado um catalisador AlCl₃, variando o solvente (tolueno e acetato de etilo) e a temperatura (tabela 3.20 - condições reacionais n)-k). Realizou-se também uma nova síntese na presença de um solvente prótico polar, o etanol, obtendo-se novamente **7c** com um bom rendimento (condição reacional p)).

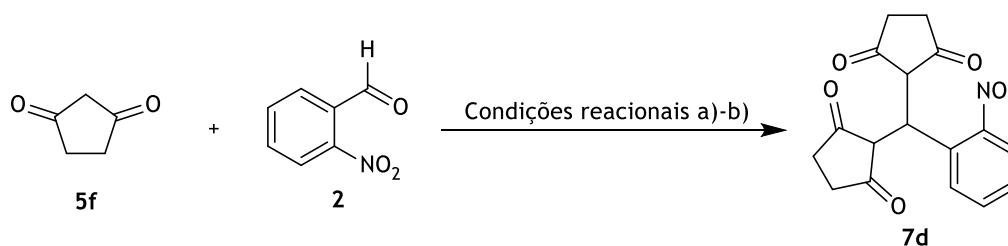
Apesar de reportado por Rajawinslin *et al.*,⁴⁰ Miri *et al.*,⁷⁹ e Motamedi *et al.*,⁸⁰ a partir da ciclohexan-1,3-diona (**5a**) e do 2-nitrobenzaldeído (**2**), na presença de ácido acético (condição reacional q)), benzeno (condição reacional r)) e uma reação de fusão (condição reacional s)), a formação de **6a** não ocorreu, verificando-se sempre e invariavelmente a formação de **7c**.

Depois do insucesso na obtenção de **6a** e, no decorrer da formação sucessiva de **7c**, tentou-se sintetizar 2-nitrofenilmetilenos **7** para os seguintes núcleos: ciclopentan-1,3-diona (**5f**); 2,2-dimetil-1,3-dioxan-4,6-diona (**5b**); 5,5-dimetilciclohexan-1,3-diona (**5d**) e ácido tiobarbitúrico (**1a**) e ácido 1,3-dietiltiobarbitúrico (**1b**). Tal como os derivados de 2-nitrobenzilidenos foram

posteriormente reduzidos para benzisoxazóis/ *N*-óxidos, estes derivados também foram sujeitos a esse processo, nos quais os resultados serão discutidos posteriormente.

3.1.4.1. Síntese da 2,2'-((2-nitrofenil)metileno)bis(ciclopentan-1,3-diona) (7d)

Como já aqui referido, a síntese do derivado de 2-nitrobenzilideno **6f** não foi conseguida, formando-se **7d** (esquema 3.14). Desta forma, como se obteve o produto com quantidades residuais de 2-nitrobenzaldeído, tentou-se uma nova condição de forma a obter exclusivamente o produto pretendido. Assim, através da condensação entre a ciclopentan-1,3-diona (**5f**) e o 2-nitrobenzaldeído (**2**), numa estequiometria de 2:1, respetivamente, e em água à temperatura ambiente obteve-se **7d** puro. Este procedimento foi simples de executar, uma vez que o produto precipitou ao longo da sua formação e, portanto, o seu isolamento revelou-se ser rápido e fácil, traduzindo-se num rendimento moderado (tabela 3.21).



Esquema 3.14 - Síntese da 2,2'-((2-nitrofenil)metileno)bis(ciclopentan-1,3-diona) (**7d**). Condições reacionais: a) H₂O/t.a; b) H₂O/t.a./Δ;).

Tabela 3.21 - Síntese da 2,2'-((2-nitrofenil)metileno)bis(ciclopentan-1,3-diona) (**7d**). Condições reacionais: a) H₂O/t.a; b) H₂O/t.a./Δ;).

Material de partida		Condições reacionais	Tempo	η (%)
5f	2			
1 eq.	1,1 eq.	a)	19 horas	c)
1 eq.	2 eq.	b)	19 horas	47

c) Composto com quantidades residuais de 2-nitrobenzaldeído.

Apesar do intervalo de fusão não estar descrito, o intervalo de fusão obtido é estreito o que revela que as impurezas que possam estar presentes não sejam significantes (tabela 3.22).

Após a análise do espetro de FTIR, observam-se as bandas características, nomeadamente a ligação C=O associada às vibrações de deformação axial a 1519 cm⁻¹ e a banda forte a 1286 cm⁻¹ de deformação axial simétrica correspondente ao grupo NO₂ (tabela 3.22).

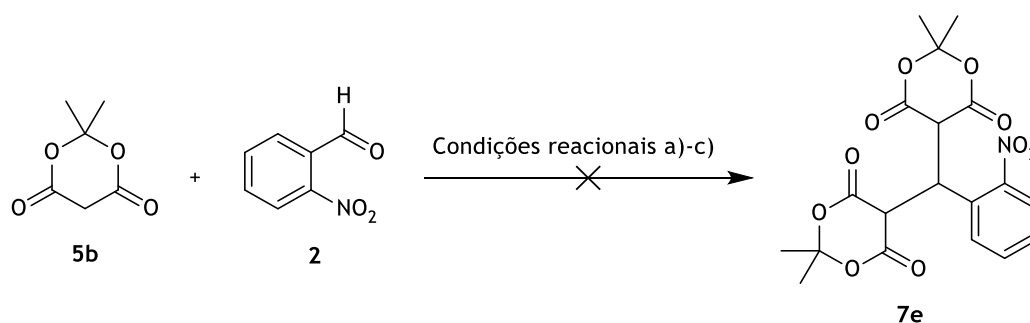
Tabela 3.22 - Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para **7d**.

Composto	FTIR (bandas características em cm ⁻¹)	Ponto de fusão (°C)	Literatura (°C)	η (%)
7d	1519 (C=O); 1286 (NO ₂)	234-235	a)	47

a) Não descrito.

3.1.4.2. Tentativas de síntese da 5,5'-((2-nitrofenil)metileno)bis(2,2-dimetil-1,3-dioxan-4,6-diona) (**7e**)

A preparação de **7e** envolve uma reação entre 2,2-dimetil-1,3-dioxan-4,6-diona (**5b**) e o 2-nitrobenzaldeído (**2**) (esquema 3.15) tendo-se realizado 3 condições diferentes (tabela 3.23).



Esquema 3.15 - Tentativas de síntese da 5,5'-((2-nitrofenil)metileno)bis(2,2-dimetil-1,3-dioxan-4,6-diona) **7e**. Condições reacionais: a) H₂O/Δ; b) EtOH/Δ; c) MeOH/Δ.

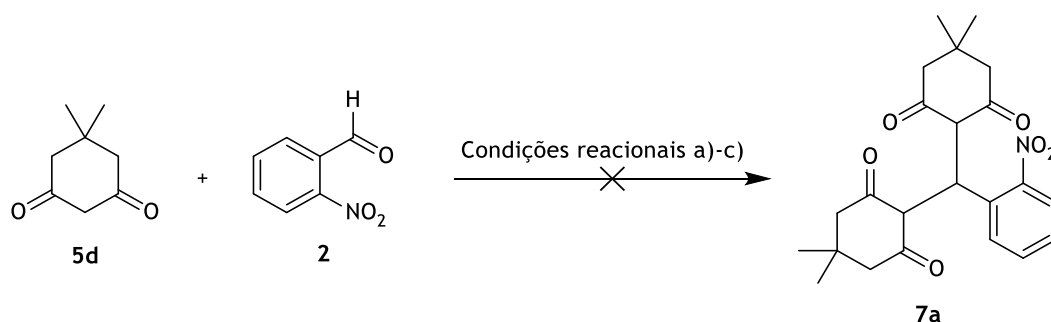
Assim, para a obtenção de **7e** utilizou-se água como solvente tendo sido a mistura colocada em refluxo, tal como realizado para a preparação de **6b**. Desta forma, para favorecer a dupla adição utilizou-se 2 equivalentes de **5b**. Verificou-se por ccf a formação **6b** impuro, ao invés da formação de **7e**. Devido ao insucesso anterior, utilizou-se etanol (condição reacional b)) uma vez que este solvente já tinha sido descrito por Murugan *et al.*,⁸¹ para a preparação de 2-nitrofenilmetilenos. Contudo, observou-se por ccf uma mistura complexa inconclusiva, não sendo possível o seu isolamento. Posteriormente, utilizou-se como solvente metanol (condição reacional c)), uma vez que este solvente permitiu a síntese de **6b**, desta forma, utilizou-se também 2 equivalentes de **5b** de modo a facilitar a dupla adição do 1,3-dicarbonilo **5b** (tabela 3.23).

Tabela 3.23 - Tentativas de síntese da 5,5'-((2-nitrofenil)metileno)bis(2,2-dimetil-1,3-dioxan-4,6-diona (**7e**). Condições reacionais: a) H₂O/Δ; b) EtOH/Δ; c) MeOH/Δ e respectivos tempos reacionais.

Material de partida		Condições reacionais	Tempo
5b	2		
2 eq.	1 eq.	a)	3 horas
2 eq.	1 eq.	b)	6 horas
2 eq.	1 eq.	c)	7 horas

3.1.4.3. Tentativas de síntese da 2,2'-((2-nitrofenil)metileno)bis(5,5-dimetilciclohexan-1,3-diona) (**7a**)

A preparação de **7a**, foi realizada a partir da 5,5-dimetilciclohexan-1,3-diona (**5d**) e o 2-nitrobenzaldeído (**2**) (esquema 3.16). Para tal, foram realizadas 3 condições diferentes que serão apresentadas seguidamente (tabela 3.24).



Esquema 3.16 - Tentativas de síntese da 2,2'-((2-nitrofenil)metileno)bis(5,5-dimetilciclohexan-1,3-diona) (**7a**); Condições reacionais: a) KOH/EtOH/H₂O/Δ; b) H₂O; c) CH₃COOH.

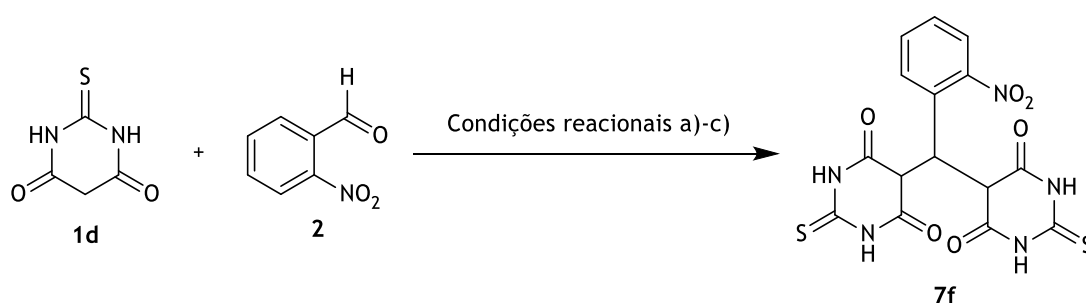
Apesar de descrito por Brito-Arias *et al.*,⁸² a síntese de **7a** a partir de **5d** e **2** na presença de hidróxido de potássio (KOH), em etanol e água (condição reacional a)), não se verificou. Assim, tal como executado nos derivados de 2-nitrofenilmetilenos acima descritos, tentou-se preparar **7a** utilizando a água como solvente (condição reacional b)) e, posteriormente, etanol (condição reacional c)). Analisando as ccf, para as 3 condições reacionais realizadas, em todas se observou a formação de uma mistura complexa, não sendo possível o seu isolamento (tabela 3.24).

Tabela 3.24 - Tentativas de síntese da 2,2'-((2-nitrofenil)metileno)bis(5,5-dimetilciclohexan-1,3-diona) (**7a**); Condições reacionais: a) KOH/EtOH/H₂O/Δ; b) H₂O; c) CH₃COOH; e respectivo tempo reacional.

Material de partida		Condições reacionais	Tempo
5d	2		
2 eq.	1 eq.	a)	43 horas
2 eq.	1 eq.	b)	3 dias
1,2 eq.	1 eq.	c)	5 dias

3.1.4.4. Síntese da 5,5'-((2-nitrofenil)metileno)bis(2-tioxodihidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona) (**7f**)

A preparação de **7f** envolve uma reação entre o ácido tiobarbitúrico (**1d**) e o 2-nitrobenzaldeído (**2**) (esquema 3.17). Para tal, foram utilizadas várias condições reacionais seguidamente (tabela 3.25).



Esquema 3.17 - Síntese da 5,5'-((2-nitrofenil)metileno)bis(2-tioxodihidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona **7f**. Condições reacionais: a) H₂O/t.a.; b) H₂O/Δ; c) EtOH/Δ.

Como reportado por Serrano *et al.*,⁶⁶ a formação de 2-nitrobenzilidenos envolve uma condensação entre o 1,3-dicarbonilo, neste caso particular, o ácido tiobarbitúrico (**1d**) e o 2-nitrobenzaldeído (**2**) em água, numa estequiometria de 1:1. Neste contexto, para a preparação de **7f**, utilizou-se o mesmo procedimento acima descrito, com uma estequiometria de 2:1 (ácido tiobarbitúrico, 1-nitrobenzaldeído, respetivamente). Por ccfc, verificou-se a formação de um novo produto, mas impuro (condição reacional a)). Na tentativa de perceber se a temperatura influenciava na reação, a mistura reacional foi sujeita a refluxo, obtendo-se da mesma forma uma mistura complexa (condição reacional b)).

Uma vez que, Murugan *et al.*,⁸¹ prepararam compostos semelhantes a **7f**, e para tal utilizaram como solvente o etanol, tentou-se reproduzir o mesmo método. Por ccfc, verificou-se a formação

apenas de um produto. Assim, como o produto precipita ao longo da sua formação, este método revelou-se ser rápido, simples permitindo obter **7f** com um rendimento moderado (tabela 3.25).

Tabela 3.25 - Síntese de 5,5'-((2-nitrofenil)metileno)bis(2-tioxohidropirimidina-4,6(1*H*,5*H*)-diona (**7f**). Condições reacionais: a) H₂O/t.a.; b) H₂O/ Δ ; c) EtOH/ Δ .

Material de partida		Condições reacionais	Tempo	η (%)
1a	2			
2 eq.	1 eq.	a)	2 horas	d)
2 eq.	1 eq.	b)	2 horas	d)
2 eq.	1 eq.	c)	5 horas e 30 min.	48

b) Formação de **7f** com quantidades residuais de 2-nitrobenzaldeído.

Após a análise do espectro de FTIR, observou-se a presença das bandas esperadas, sendo de destacar a banda fraca de deformação angular, correspondente à ligação N-H a 3084 cm⁻¹, uma banda a 1621 cm⁻¹, associada às vibrações de deformação axial relativa à ligação C=O e duas bandas fortes de deformação axial assimétrica e simétrica, a 1519 e 1348 cm⁻¹, respetivamente as quais correspondem ao grupo NO₂ (tabela 3.26).

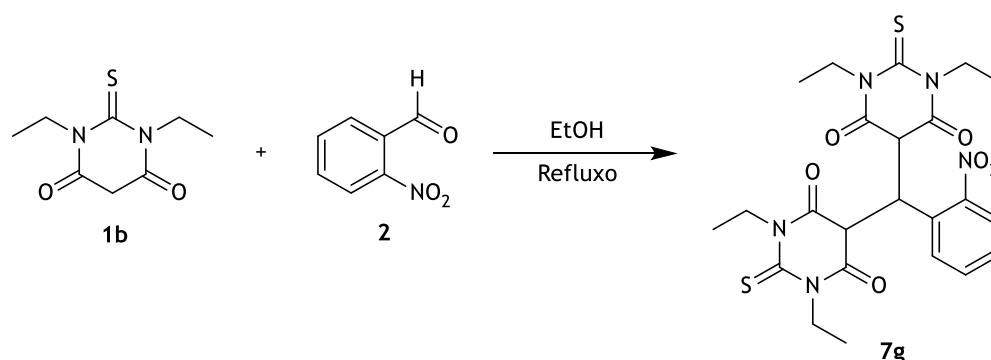
Tabela 3.26 - Bandas caraterísticas dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para **7f**.

Composto	FTIR (bandas caraterísticas em cm ⁻¹)	Ponto de fusão (°C)	Literatura (°C)
7f	3084 (N-H); 1621 (C=O); 1519 e 1348 (NO ₂)	230-231 dec.	a)

a) Não descrito.

3.1.4.5. Síntese da 5,5'-((2-nitrofenil)metileno)bis(1,3-dietil-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1*H*,5*H*)-diona) (**7g**)

A preparação de 5,5'-((2-nitrofenil)metileno)bis(1,3-dietil-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1*H*,5*H*)-diona) (**7g**) foi realizada com base no método descrito por Murugan *et al.*,⁸¹ sendo um procedimento simples e fácil permitiu obter **7g** com um rendimento moderado (tabela 3.27).



Esquema 3.18 - Síntese 5,5'-((2-nitrofenil)metileno)bis(1,3-dietil-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona) (**7g**).

Relativamente ao intervalo de fusão obtido, este é estreito, demonstrando que as impurezas que possam efetivamente estar presentes não são significantes (tabela 3.27).

Do espectro de FTIR, podem ser analisadas as bandas características dos grupos funcionais principais, nomeadamente a ligação C=O a 1606 cm^{-1} , associada às vibrações de deformação axial, duas bandas fortes de deformação axial assimétrica e simétrica a 1525 e 1373 cm^{-1} , respetivamente, as quais correspondem ao grupo NO_2 e a uma banda forte a 1265 cm^{-1} característica da ligação C=S (tabela 3.27).

Tabela 3.27 - Bandas caraterísticas dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para **7g**.

Composto	FTIR (bandas caraterísticas em cm^{-1})	Ponto de fusão ($^{\circ}\text{C}$)	Literatura ($^{\circ}\text{C}$)	η (%)
7g	1606 (C=O); 1525 e 1373 (NO_2); 1265 (C=S)	176-177	a)	60

a) Não descrito.

3.1.5. N-óxidos de quinolina 8a-c

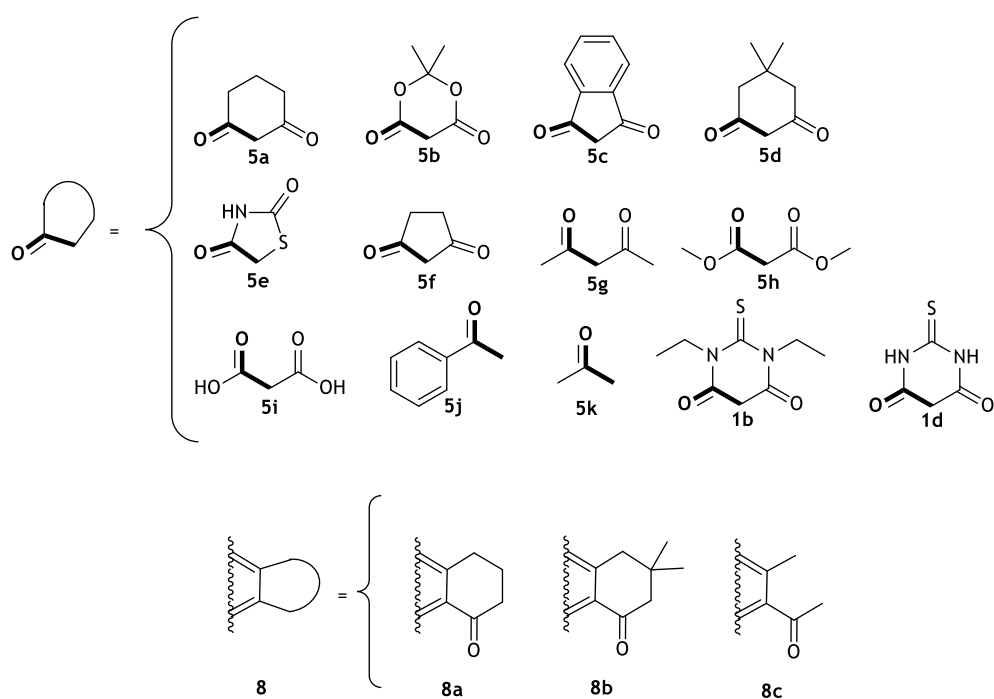
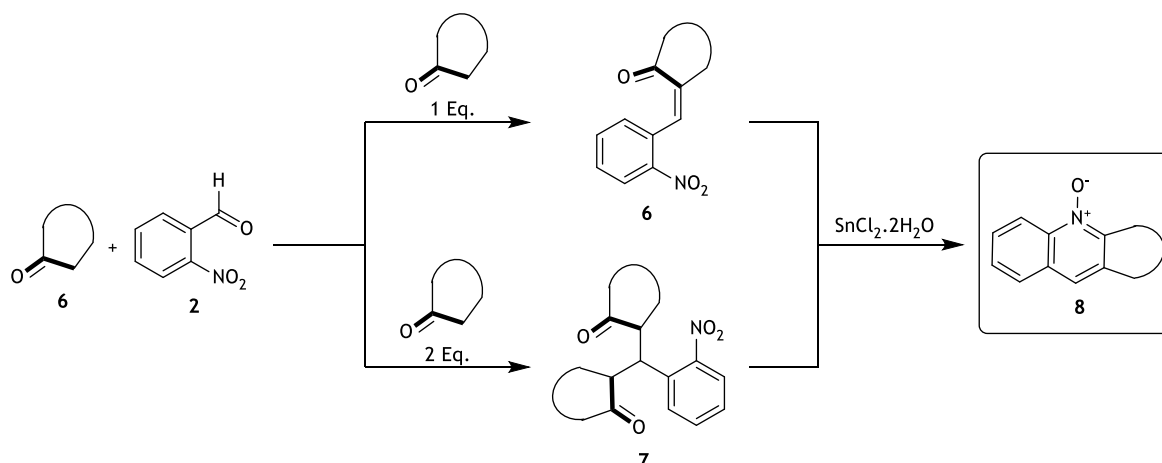
Tal como referido anteriormente e de acordo com Serrano *et al.*,⁶⁶ a preparação de 5-(benzisoxazol-3-ilideno)pirimidinas **4** a partir de 5-(2-nitrobenzilideno)pirimidinas **3**, na presença de ácido clorídrico concentrado e cloreto de estanho di-hidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em THF, demonstrou ser um método simples e bastante rápido para a obtenção do produto puro. Neste contexto, e sendo um dos objetivos desta dissertação, tentou-se utilizar esse procedimento para a preparação de derivados de 5-(benzisoxazol-3-ilideno)pirimidinas a partir dos 2-nitrobenzilidenos cíclicos, acíclicos **6** e dos 2-nitrofenilmetilenos **7** anteriormente obtidos.


No entanto aquando da preparação dos derivados 5-(benzisoxazol-3-ilideno)pirimidinas a partir de **6a** verificou-se por ccf a formação de um novo produto o qual não correspondia aos derivados

pretendidos. Na tentativa de sintetizar derivados de **4**, realizou-se um novo método na presença de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MeOH e EtOAc (1:1) à temperatura ambiente. Este método foi executado com base em Chauhan *et al.*,⁸³ verificando-se por ccf o mesmo produto obtido no método anteriormente realizado. Pelo espectro de ^1H , ^{13}C e bidimensionais concluiu-se que o composto formado era um derivado *N*-óxido de quinolina. Desta forma, tentou-se explorar esta nova via sintética para alguns dos compostos anteriormente sintetizados, nomeadamente para **6b**, **6e**, **6g**, **6h**, **6i** e a partir da mistura de **6d/7a** (esquema 3.19). Relativamente aos precursores referidos anteriormente, apenas a partir de **6a**, mistura de **6d/7a**, e **6g**, se obteve os *N*-óxidos **8a**, **8b** e **8c**, respetivamente (esquema 3.19).

Na tentativa de remover o $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ resistente no produto final após filtração, foram realizadas sucessivas extrações utilizando AcOEt e uma solução de NaOH a 5%. Durante as extrações, o produto ficou retido na fase orgânica, e observou-se a formação de um precipitado branco na fase aquosa, o qual foi filtrado a vácuo prosseguindo-se as extrações. Assim, este processo de isolamento permitiu a obtenção do composto puro e com um elevado rendimento (tabela 3.28). Este procedimento foi adaptado para os restantes *N*-óxidos obtidos, sendo de destacar que para a obtenção de **8b**, apesar de se terem realizado extrações sucessivas, ainda foi necessária uma recristalização para obter o produto pretendido.

Na realização da síntese de *N*-óxidos a partir dos precursores **6b**, **6h** e **6i**, verificou-se por ccf e por RMN de ^1H a obtenção de uma mistura complexa e, portanto, não foi possível o seu isolamento. Por outro lado, quando se realizou a síntese e, na tentativa de obter *N*-óxidos a partir de **6e**, observou-se, tanto por ccf como por RMN de ^1H , a formação de um único composto puro ainda não tendo sido possível a atribuição estrutural inequívoca. Neste contexto, é importante realçar que, quando se realizavam as sínteses com precursores que continham heteroátomos na estrutura de 1,3-dicarbonilos, não se verificava a formação de *N*-óxidos, observando-se, para a maioria dos casos, a formação de uma mistura complexa. No entanto, e nos casos aqui estudados, quando eram utilizados precursores sem heteroátomos verificava-se a formação privilegiada de *N*-óxidos.



Nota:  = estruturas cíclicas ou acíclicas.

Esquema 3.19 - Síntese de **8** a partir de 2-nitrobenzilidenos **6** e 2-nitrofenilmetilenos **7**.

Relativamente à redução dos derivados de 2-nitrofenilmetilenos, nomeadamente de 2,2'-((2-nitrofenil)metileno)bis(ciclohexan-1,3-diona) (**7a**) observou-se novamente a formação inesperada de *N*-óxidos **8a**, quando as condições reacionais acima referidas eram aplicadas, além das extrações realizadas foi necessário proceder-se a uma recristalização de forma a obter o produto pretendido. A preparação de **8a** a partir de **7c**, mostra ser uma via alternativa à síntese de *N*-óxidos, contudo, esta via traduz-se em rendimentos mais baixos relativamente a formação de **8a** a partir de **6a**. Por outro lado, quando o precursor **7a** foi submetido às mesmas

condições, verificou-se a formação de uma mistura complexa. Assim, tal como na preparação de **8** a partir de **6**, pode-se referir que a presença de heteroátomos é um fator decisivo para a formação bem-sucedida e praticamente exclusiva de *N*-óxidos.

Tabela 3.28 - Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para os compostos **8a**, **8b** e **8c**.

Composto	FTIR (bandas características em cm ⁻¹)	Ponto de fusão (°C)	Literatura (°C)	η (%)
8a	1700 (C=O); 1563 e 1317 (N-O)	191-192	a)	96
8b	1693 (C=O); 1568 e 1319 (N-O)	174-175	a)	30
8c	1686 (C=O); 1424 (N-O)	127-128	a)	65
a)	Não descrito.			

Os intervalos de fusão obtidos são estreitos, o que permite inferir que as impurezas que possam estar presentes não são muito significativas (tabela 2.28). Relativamente aos espectros de FTIR, os compostos apresentam as bandas características, nomeadamente a banda correspondente a ligação C=O a 1700, 1693 e 1686 cm⁻¹ para **8a**, **8b** e **8c**, respetivamente e duas bandas a 1563, 1568, 1424 e 1317 e 1319 ppm responsáveis pelo grupo NO₂ para **8a**, **8b** e **8c**, respetivamente (tabela 2.28).

Através dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C, foi possível identificar todos os sinais correspondentes para os produtos **8a**, **8b** e **8c**. No espectro de RMN de ¹H, observa-se o singuleto característico a 8,47, 8,46 e 8,47 ppm para **8a**, **8b** e **8c**, respetivamente (tabela 3.29). Por outro lado, pelo espectro de ¹³C, observa-se o sinal a 196,03, 199,66 e 196,35 ppm para **8a**, **8b** e **8c**, respetivamente), característico do grupo carbonilo (tabela 3.30).

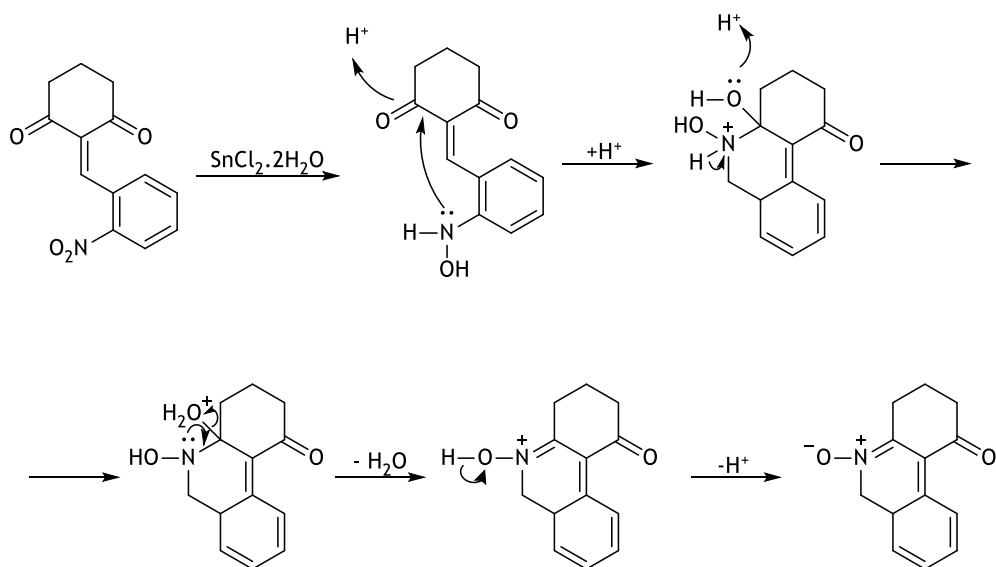
A formação do *N*-óxido de quinolina **8a**, pode ser explicada por duas vias diferentes (esquema 3.20 e 3.21). A partir de **6a** o grupo NO₂ é reduzido parcialmente a uma hidroxilamina, a qual permite que ocorra uma ciclização. Posteriormente, ocorre aromatização e consequentemente saída de água de forma a obter o produto **8a** (esquema 3.20). A partir de **7c**, ocorrem as mesmas etapas anteriormente referidas, contudo, em vez da eliminação de água, ocorre a eliminação de um dos núcleos de 1,3-dicetona (esquema 3.21).

Tabela 3.29- RMN de ^1H dos compostos **8a-c**, em $\text{DMSO}-d_6$.

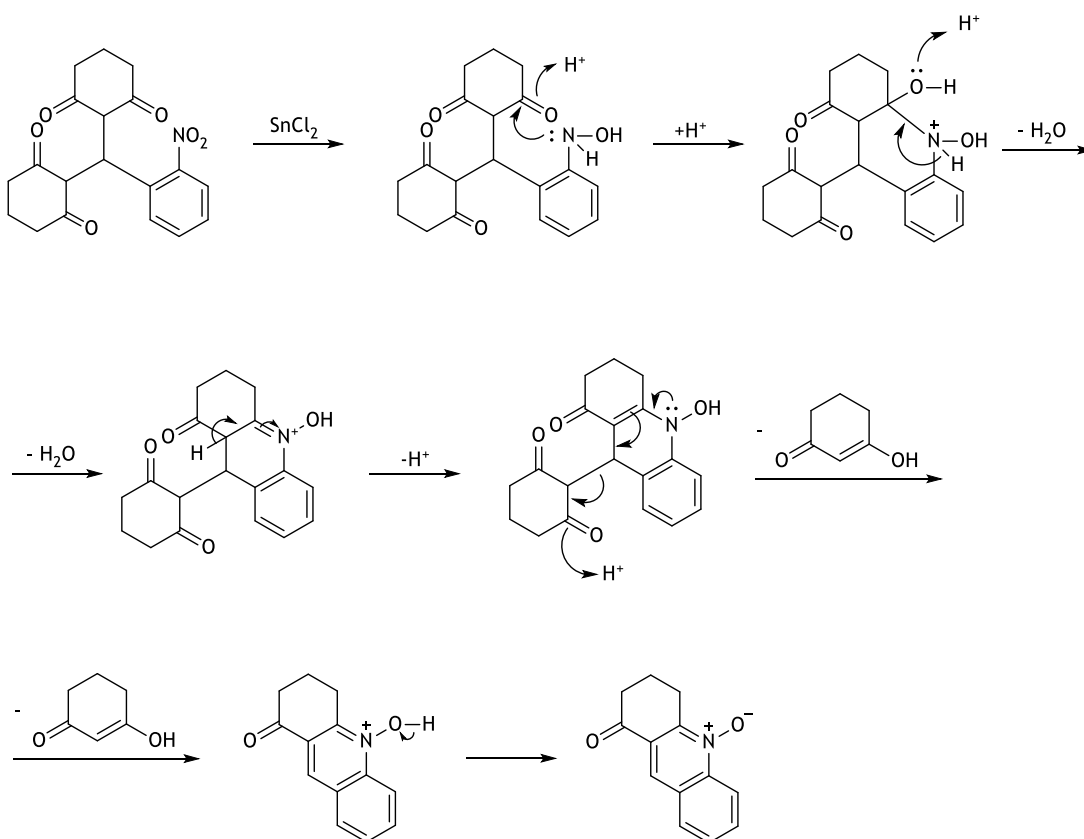
8a-b/8c						
Composto	5-ArCH/8-ArCH (J em Hz)	9-ArCH/4-ArCH (J em Hz)	8-ArCH/5-ArCH (J em Hz)	6-ArCH/7-ArCH (J em Hz)	7-ArCH/6-ArCH (J em Hz)	Outros sinais (J em Hz)
8a	8,57 (dd, 1H, J = 8,7 e 1,1 Hz)	8,47 (s, 1H)	8,31 (dd, 1H, J = 8,3 e 1,3 Hz)	7,95 (ddd, 1H, J = 8,6, 6,9 e 1,4 Hz)	7,77 (ddd, 1H, J = 8,1, 6,9 e 1,0 Hz)	3,25 (t, 2H, J = 6,3 Hz, 4-CH ₂); 2,73 (t, 2H, J = 6,5 Hz, 2-CH ₂); 2,17 (p, 2H, J = 6,5 Hz, 3-CH ₂)
8b	8,57 (dd, 1H, J = 8,8 e 1,1 Hz)	8,47 (s, 1H)	8,31 (dd, 1H, J = 8,2 e 1,4 Hz)	7,94 (ddd, 1H, J = 8,6, 6,9 e 1,4 Hz)	7,77 (ddd, 1H, J = 8,1, 6,9 e 1,2 Hz)	3,18 (s, 2H, 4-CH ₂); 2,66 (s, 2H, 2-CH ₂); 1,09 (s, 6H, 3-C(CH ₃) ₂)
8c	8,56 (dd, 1H, J = 8,7 e 1,0 Hz)	8,46 (s, 1H)	8,16 (dd, 1H, J = 8,2 e 1,4 Hz)	7,92 (ddd, 1H, J = 8,6, 7,0 e 1,5 Hz)	7,77 (ddd, 1H, J = 8,2, 7,0 e 1,2 Hz)	2,72 (s, 3H, 2-ArCCCH ₃); 2,64 (s, 3H, 3-ArCCOCH ₃)

Tabela 3.30 - RMN de ^{13}C dos compostos **8a-c**, em $\text{DMSO}-d_6$.

8a-b/8c											
Composto	1-CO/ 3-ArCCO	4a-ArC/ 2-ArC	10a-ArC/ 8a-ArCH	6-ArCH/ 7-ArCH	8-ArCH/ 5-ArCH	7-ArCH/ 6-ArCH	8a-ArC/ 4a-ArC	9a-ArC/ 3-ArC	9-ArCH/ 4-ArCH	5-ArCH/ 8-ArCH	Outros sinais
8a	196,03	148,74	142,41	132,75	130,89	128,58	127,43	127,36	127,08	118,79	37,75 (2-CH ₂); 29,75 (4-CH ₂); 19,48 (3-CH ₂)
8b	196,35	147,31	142,78	132,78	131,06	128,81	127,46	126,45	123,17	118,92	50,66 (2-CH ₂); 32,27 (4-CH ₂); 31,44 (3-C); 28,24 ((CH ₃) ₂)
8c	199,66	143,74	141,19	133,41	132,32	129,62	128,71	127,03	125,48	119,02	29,76 (3-ArCCOCH ₃); 15,51 (2-ArCCCH ₃)



Esquema 3.20 - Mecanismo reacional do *N*-óxido de quinolina **8a** a partir do derivado 2-nitrobenzilideno cíclico **6a**.

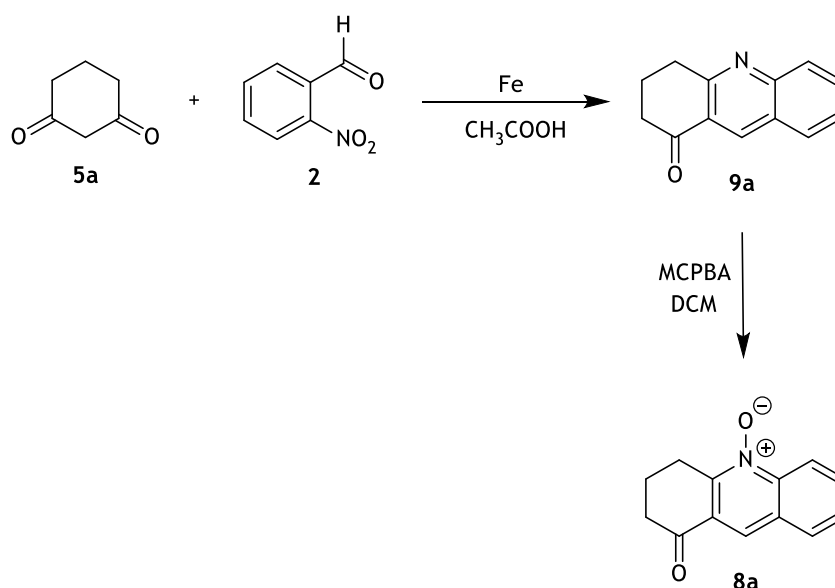


Esquema 3.21 - Mecanismo reacional do *N*-óxido de quinolina **8a** a partir do derivado 2-nitrofenilmetileno **7c**.

3.1.6. Quinolinas 9

3.1.6.1. Síntese de 3,4-dihidroacridin-1(2H)-ona (9a)

A síntese de quinolina **9a**, envolve uma reação entre a ciclohexan-1,3-diona (**5a**) e o 2-nitrobenzaldeído (**2**), na presença de ferro e acético a 50 °C (esquema 3.22). Este método foi realizado com base no método descrito por Rajawinslin *et al.*,⁴⁰ sendo um método simples e rápido permitindo obter o produto. Apesar de ser necessário realizar uma recristalização, foi possível obter o produto puro com um rendimento moderado (tabela 3.31).



Esquema 3.22 - Síntese da quinolina **9a** e do respetivo N-óxido **8a**.

Relativamente ao intervalo de fusão obtido, este encontra-se significativamente abaixo do intervalo de fusão teórico, contudo, é de destacar que este intervalo é estreito o que as impurezas que possam eventualmente estar presentes não são significantes (tabela 3.31).

Da análise do espectro de FTIR, observam-se as bandas características, nomeadamente a ligação C=O a 1678 cm⁻¹ associada às vibrações de deformação axial e uma banda forte de deformação axial assimétrica a 1592 cm⁻¹ correspondente ao grupo NO₂ (tabela 3.31).

Tabela 3.31 - Bandas características dos espectros de FTIR, ponto de fusão, ponto de fusão da literatura e rendimento para o composto **9a**.

Composto	FTIR (bandas características em cm ⁻¹)	Ponto de fusão (°C)	Literatura (°C)	η (%)
9a	1678 (C=O); 1592 (N-O)	54-55	94-95 ⁸⁴	50

De forma a comprovar inequivocamente a estrutura de **8a**, realizou-se posteriormente uma reação de oxidação a partir de **9a** de forma a obter o *N*-óxido correspondente, **8a** (esquema 3.22). Assim, oxidou-se **9a** (1 eq.) na presença de um oxidante, o ácido metacloroperoxibenzoíco (MCPBA) (2 eq.) em DCM durante um dia. Este método foi realizado de acordo com o descrito por FAMILONI *et al.*,⁵⁴ fazendo-se uma alteração ao solvente, utilizando DCM.

A formação de **8a** a partir de **9a** é uma via alternativa que confirmou a formação do *N*-óxido a partir dos 2-nitrobenzilidenos, mais precisamente de **6a**, e dos 2-nitrofenilmetilenos, **7c**. Uma vez que a síntese deste não foi esperada, inicialmente surgiram dificuldades na caracterização do mesmo. Desta forma, foi realizada a reação descrita anteriormente, com o objetivo de validar a formação de **8a**, uma vez que **9a** já se encontrava descrita. Assim, esta via é fulcral uma vez que permitiu confirmar a estrutura de **8a**. Contudo, é importante realçar que a quinolina **9a** também pode ser convertida em **8a**, através de uma reação de redução com PBr₃ (dados não apresentados), tal como descrito por FAMILONI *et al.*⁵⁴

3.2. Avaliação Biológica *in vitro*

3.2.1. Determinação da capacidade inibitória da atividade da XO

A capacidade inibitória da atividade da XO por parte da família de compostos sintetizados foi avaliada espectrofotometricamente, utilizando o alopurinol como controlo positivo, e medindo os níveis de formação de ácido úrico a um comprimento de onda de 295 nm. De maneira a garantir o intervalo de concentração em que há linearidade de absorvância, foi realizada uma curva de calibração para várias concentrações de ácido úrico a 295 nm, observando-se haver linearidade pelo menos entre 1,5 e 400 μM (gráfico 3.1).

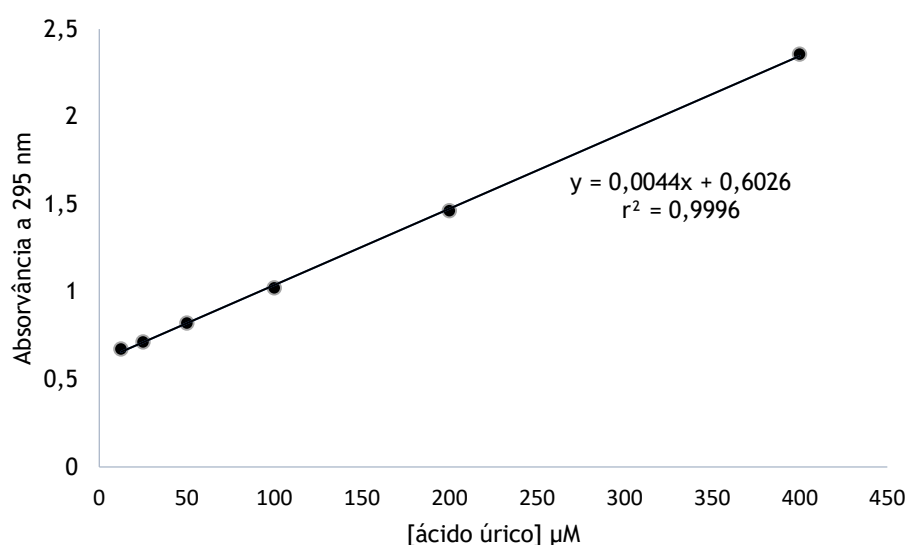


Gráfico 3.1 - Curva de calibração para o ácido úrico a 295 nm, com a respetiva equação da reta e o seu r^2 .

Para a realização do *screening* foi utilizada uma concentração de 30 μM de cada composto em estudo, em cada poço, seguindo as condições descritas por Figueiredo *et al.*²⁸

De modo a interpretar os resultados, escolheu-se o minuto cinco como minuto representativo, uma vez que foi neste tempo em que se atingiu o máximo de inibição do alopurinol (gráfico 3.2 e gráfico 3.3).

Após análise dos resultados obtidos no *screening* (gráfico 3.2), verifica-se que o derivado 2-nitrofenilmetileno **7g** apresenta boa capacidade de inibição da atividade enzimática, com percentagem de inibição de 78%, ligeiramente superior ao alopurinol, utilizado como composto de referência. Neste contexto, no que diz respeito aos derivados de 2-nitrofenilmetilenos, é de salientar a importância do grupo etilo nas posições 1 e 3 do núcleo do ácido tiobarbitúrico na inibição da atividade enzimática. As 5-(2-nitrobenzilideno)pirimidinas **3a-c**, mostraram uma

moderada capacidade de inibição sendo esta de 41, 67 e 41%, respectivamente, no entanto, inferiores ao alopurinol. Dentro desta classe de compostos verifica-se novamente a importância do grupo etilo, quando comparado com o grupo metilo. Relativamente à classe dos 2-nitrobenzilidenos destaca-se a 2-(2'-nitrobenzilideno)ciclohexan-1,3-diona (**6a**) com percentagem de inibição de 35%, superior à do seu análogo 2,2-dimetil-5-(2-nitrobenzilideno)-1,3-dioxan-4,6-diona (**6b**), que apresenta uma inibição de 29%. É ainda de salientar que o 2-(2-nitrobenzilideno)malonato de dimetilo (**6h**) parece estimular a produção de ácido úrico. O mesmo se observou para o *N*-óxido de quinolina **8a** e respectiva quinolina **9a**.

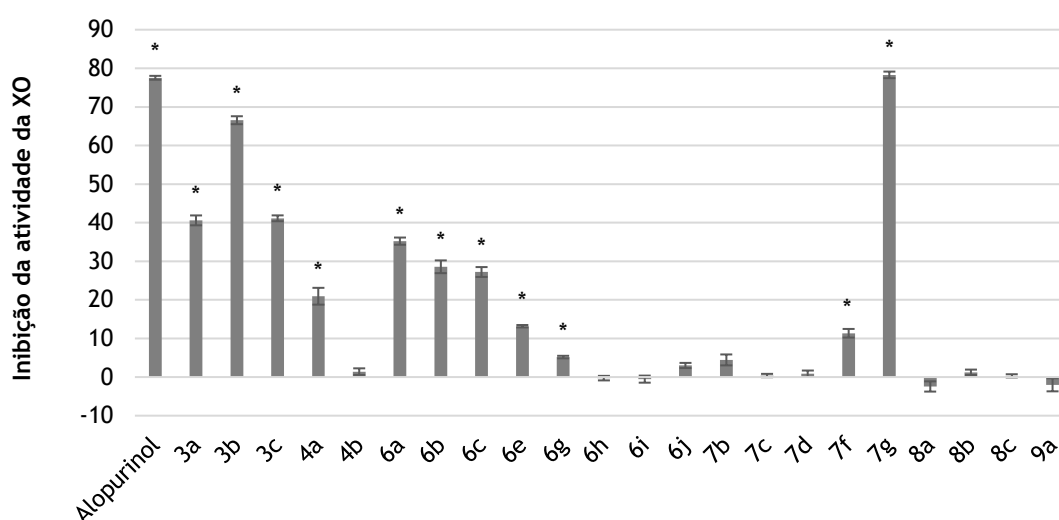


Gráfico 3.2 - Percentagem de inibição da atividade da XO por parte dos compostos **3a-c**, **4a-b**, **6a-c**, **6e**, **6g-6j**, **7b**, **7c**, **7d**, **7f**, **7g**, **8a-c** e **9a** e alopurinol, utilizado como controlo positivo, a uma concentração de 30 μ M e após 5 minutos de incubação. Os dados são apresentados com os respetivos erros padrão (SEM - do inglês *standard error of the mean*) e são representativos das duas experiências independentes realizadas. * $p < 0.05$ em relação ao controlo (Teste-*t* de Student).

Para os compostos para os quais se observaram percentagens de inibição da atividade enzimática superiores a 25%, foram realizados estudos de análise de inibição ao longo do tempo, assim como estudos de concentração-resposta.

Após a análise dos dados referentes à inibição da atividade enzimática ao longo de 10 minutos (gráfico 3.3), verifica-se que o 2-nitrofenilmetileno **7g** e a 2-(nitrobenzilideno)pirimidina **3b** apresentam um perfil inibitório idêntico ao do alopurinol, ao contrário dos restantes compostos cuja atividade inibitória decresce significativamente após o sexto minuto de incubação.

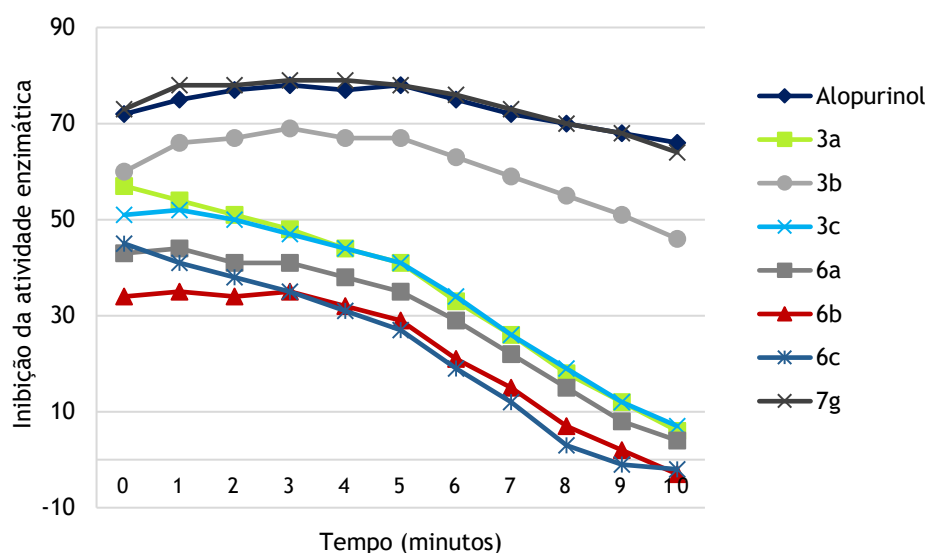


Gráfico 3.3 - Porcentagem de inibição da atividade enzimática da XO em função do tempo, para os compostos **3a-c**, **6a-c**, **7g** e alopurinol a uma concentração de 30 μ M.

Após a realização dos estudos de concentração-resposta, foi possível estimar os valores de concentração inibitória para metade da atividade máxima (IC₅₀ - do inglês, *half maximal inhibitory concentration*) para os compostos em estudo (tabela 3.32). O alopurinol apresenta um IC₅₀ calculado de 9,00 μ M, próximo do valor descrito na literatura (8,50 μ M).³³ Quando comparados com o alopurinol, todos os compostos em estudo, com exceção do **7g**, com IC₅₀ de 6,1 μ M, apresentam valores de IC₅₀ mais elevados. Assim, devem ser efetuados mais estudos, nomeadamente a realização de gráficos de Lineweaver-Burk, para uma melhor compreensão do tipo de inibição em causa assim, como da cinética da reação.

Tabela 3.32 - Valores de IC₅₀ estimados por ajuste sigmoidal para a inibição da atividade da XO dos compostos alopurinol, **3a-c**, **6a-c** e **7g**.

Composto	IC ₅₀ (μ M)	r ²
Alopurinol	9,00	0,9248
3a	37,39	0,9774
3b	10,63	0,9767
3c	28,47	0,9782
6a	60,23	0,9253
6b	79,64	0,9187
6c	76,51	0,9276
7g	6,1	0,9782

3.2.2. Determinação dos efeitos na proliferação celular

Para avaliar o efeito dos compostos na proliferação celular, utilizou-se o método colorimétrico de MTT, após 72h de exposição aos mesmos.²⁸

Os efeitos dos compostos sintetizados na proliferação das células NHDF e MCF-7 foram comparados com os do controlo positivo 5-fluorouracilo (5-FU), um anti tumoral em uso clínico.⁸⁵

Assim, e tal como efetuado nos estudos de inibição da XO, foi realizado um *screening*, a uma concentração de 30 μ M, em ambos os tipos de células referidos. Através da análise dos resultados (gráfico 3.4) pode-se concluir que existe uma citotoxicidade relevante por parte de alguns compostos sintetizados nas células NHDF, nomeadamente de **6g**, **6h** e **7b**, observando-se uma percentagem de proliferação celular inferior à observada com o 5-FU.

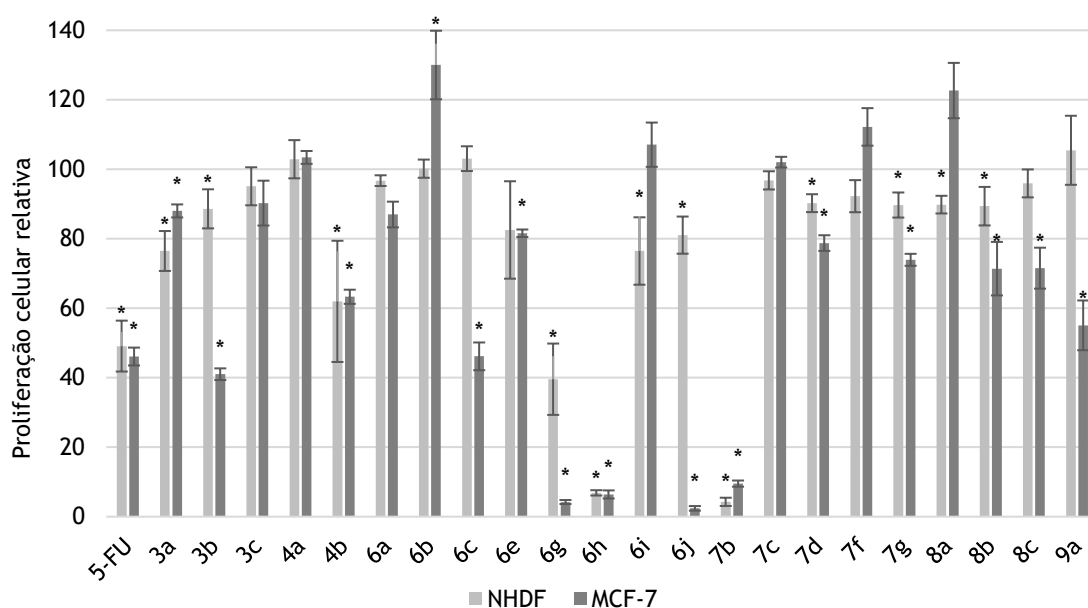


Gráfico 3.4 - Percentagem relativa de proliferação celular em células NHDF e MCF-7 após 72 horas de exposição aos compostos 5-FU, **3a-c**, **4a-b**, **6a-c**, **6e**, **6g-j**, **7b**, **7c**, **7d**, **7f**, **7g**, **8a-c** e **9a** a uma concentração de 30 μ M. Os dados são apresentados com os respetivos erros padrão (SEM - do inglês *standard error of the mean*), e são representativos das duas experiências independentes realizadas (NHDF) e única experiência representativa (MCF-7). * $p < 0.05$ em relação ao controlo (Teste-*t* de student).

Após o *screening* inicial, foram realizados estudos de concentração-resposta para os compostos mais citotóxicos (**6g**, **6h**, **6j** e **6k**) e para o 5-FU. Neste estudo, as células foram tratadas e expostas a concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 30 e 50 μ M dos compostos selecionados, durante 72 h.

Através da análise dos resultados (tabela 3.33), verifica-se que, apesar da citotoxicidade observada no *screening* inicial, o 2-nitrofenilmetileno **7b** foi o único que mostrou uma potência superior à do 5-FU, com IC₅₀ calculado de 1,06 µM. Adicionalmente o 2-nitrobenzilideno **6j**, apresenta um valor de IC₅₀ de 10,24 µM, o qual também apresenta uma citotoxicidade relevante.

Tendo em conta os resultados obtidos no ensaio enzimático, verificou-se que as 5-(2-nitrobenzilideno)pirimidinas **3a-c**, os 2-nitrobenzilidenos derivados de 1,3-dicarbonilos **6a-c** e o 2-nitrofenilmetileno derivado 1,3-dicarbonilo **7g**, apresentam uma boa capacidade inibitória da XO. Por outro lado, os compostos referidos anteriormente apresentam pouca citotoxicidade em NHDF sendo este um fator importante e promissor.

Tabela 3. 33 - Valores de IC₅₀ estimados por ajuste sigmoidal para a inibição da atividade anti proliferativa nas células NHDF dos compostos **5-FU**, **6g**, **6h**, **6j** e **6k**.

Composto	IC ₅₀ (µM)	r ²
5-FU	1,13	0,8593
6g	>50	0,8642
6h	31,08	0,9054
6j	10,24	0,8492
7b	1,06	0,9884

Após a realização do ensaio de citotoxicidade em células NHDF, determinou-se a potencial atividade anti-proliferativa dos compostos numa linha celular cancerígena (MCF-7). Assim, novamente se efetuou um *screening* dos efeitos de todos os compostos sintetizados a uma concentração de 30µM.

Através da análise dos resultados obtidos (gráfico 3.4), verifica-se que compostos **3b**, **6g**, **6h**, **6j** e **7b** originam uma percentagem de proliferação celular inferior à observada com o 5-FU. É de referir que os compostos **6g**, **6h** e **7b** também apresentam citotoxicidade marcada em NHDF. No entanto, para o (*E*)-3-(nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**6j**), o mesmo não se verifica, uma vez que apresenta uma diminuição da proliferação das células MCF-7 e uma percentagem de proliferação, em cerca de 80%, para as NHDF, mostrando-se este bastante promissor. Para o 1,3-dietil-5-(2-nitrobenzilideno)pirimidina-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triona (**3b**) e para o 2-(2-nitrobenzilideno)-1*H*-inden-1,3(2*H*)-diona (**6c**) verifica-se que ambos apresentam pouca citotoxicidade em NHDF e, por outro lado, apresentam uma diminuição da proliferação das células MCF-7, o que poderá ser um fator importante. Após uma análise geral dos resultados obtidos para as linhas celulares estudadas (gráfico 3.4), verifica-se que **4a**, **6c** e **9a**, estimulam

a proliferação celular em NHDF, no entanto **4a**, **6b**, **7f** e **8a** promovem um aumento da proliferação celular em MCF-7.

Após a realização do *sreening* inicial é pertinente a realização de um estudo de concentração-resposta para os compostos mais citotóxicos, a realizar futuramente.

3.3. Estudos *in silico*

3.3.1. *Docking* molecular

Tendo como ponto de partida os resultados experimentais obtidos para a inibição da atividade da XO, foi realizado um estudo de *docking* molecular para o alopurinol e para aos compostos **3a**, **3b**, **3c**, **6a**, **6b**, **6c** e **7g**, com o objetivo de obter mais informações sobre as energias previstas e o seu local de ligação.

Para efetuar a validação do método, foi realizado o *re-docking* entre o ligando original co-cristalizado (Y-700) e a XO.⁸⁶ Para o *re-docking* do ligando Y-700 com a proteína, no seu sítio ativo, foi obtido um valor de desvio da raiz quadrada média (RMSD - do inglês, *root mean square deviation*) de 0,78 Å, valor abaixo do padrão de 2 Å, tendo-se considerado o método como validado. As simulações de quantificação de energia que foram realizadas para os ligandos Y-700, alopurinol, **3a**, **3b**, **3c**, **6a**, **6b**, **6c** e **7g**, encontram-se na tabela 3.34. Os resultados não se encontram de acordo com os observados nos ensaios *in vitro* para a inibição da atividade da XO, exceto para o 2-nitrofenilmetileno **7g**, uma vez que apresentou um resultado de inibição enzimática melhor que o alopurinol tanto nos ensaios *in vitro* como nos estudos *in silico*.

Na tentativa de compreender o resultado da inibição *in vitro* da atividade enzimática, uma vez que a energia de ligação obtida é mais favorável para **3a**, **3b**, **3c**, **6a**, **6b**, **6c** e **7g**, foram também estudadas as interações desses compostos, do ligando Y-700 e do alopurinol com o sítio ativo da proteína (tabela 3.34), verificando-se que o Y-700 e o alopurinol apresentam as interações esperadas (figura 3.1). De acordo com a literatura, as interações por pontes de hidrogénio entre os ligandos e os resíduos de glutamina 802 (GLU802), arginina 880 (ARG880) e treonina 1010 (THR1010) são bastante importantes.⁸⁷⁻⁸⁸

Neste contexto, observa-se que todos os compostos em estudo, exceto **6b**, não estabelecem todas as interações acima referidas. Estes dados podem levar a inferir que as interações entre os ligandos e o sítio ativo da proteína também podem desempenhar um papel preponderante na inibição enzimática, uma vez que, apesar das energias de ligação dos compostos em estudo serem relevantes, no ensaio *in vitro* não ocorreu inibição enzimática superior à observada com o alopurinol, à exceção do composto **7g**, sendo que este também não estabelece nenhuma das interações acima referidas para o ligando Y-700 e para o alopurinol.

Tabela 3.34 - Energias de ligação e interações por pontes de hidrogénio dos compostos Y-700, alopurinol, **3a**, **3b**, **3c**, **6a**, **6b**, **6c** e **7g**, no sítio ativo da XO.

Ligandos	Energia de ligação (Kcal/mol)	Resíduos presentes nas interações por pontes de hidrogénio
Y-700	-8,17	ARG880, GLU802, ASN 768, LIS 771
Alopurinol	-6,29	ARG880, GLU802, MOS3004
3a	-8,02	LIS771, ASN768
3b	-7,49	LIS771, SER876
3c	-8,45	LIS771, ASN768
6a	-7,50	LIS771, ASN768
6b	-8,13	ARG880, THR 1010, VAL 1011
6c	-8,34	ASN768, LIS771, SER876
7g	-8,61	SER 876, LIS 771

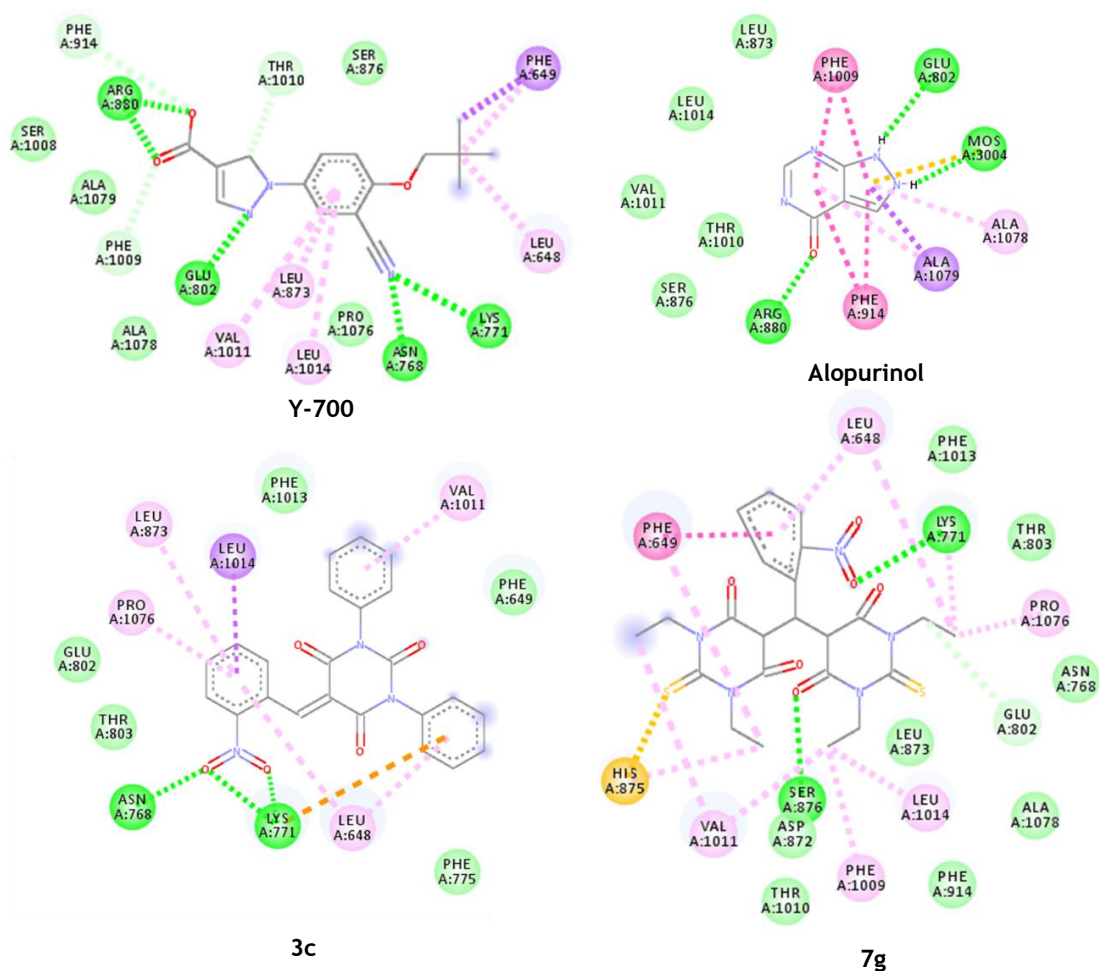


Figura 3.1 - Interações entre o ligando original (Y-700), alopurinol, **3c** e **7g** e a XO. Verde - pontes de hidrogénio; verde claro - interações de van der Walls; roxo - interações Pi-Sigma; amarelo - interações Pi-enxofre; rosa - interações Pi-Pi e rosa claro - interações Pi - alquilo.

3.3.2. Previsão de propriedades farmacocinéticas

Com base nos resultados obtidos na determinação *in vitro* da atividade inibitória da XO e nos estudos de proliferação celular, foram realizados também estudos *in silico* para a predição de propriedades farmacocinéticas relevantes, com o objetivo de obter um maior número de informação sobre estes compostos. Desta forma, foram calculados os descritores das regras de Lipinski, parâmetros de Veber e propriedades ADMET para as os compostos **3a**, **3b**, **3c**, **6a**, **6b**, **6c**, **6j** e **7g** pelo *software* pkSCM *on-line*.

Através da análise da tabela 3.35, pode-se concluir que, à exceção do **7g**, todos os outros compostos se encontram dentro dos limites definidos pelos parâmetros definidos por Veber²⁰ e Lipinski,⁸⁹⁻⁹⁰ o que indica que apresentam uma probabilidade mais elevada de terem absorção oral. O derivado 2-nitrofenilmetileno **7g**, viola as regras de Lipinski quanto à massa molecular e aos aceitadores das pontes de hidrogénio, e os parâmetros de Veber quanto à área superficial.

Tabela 3.35 - Dados computacionais para os descritores das regras de Lipinski e parâmetros de Veber, calculados através do *software* pkSCM *on-line* para **3a**, **3b**, **3c**, **6a**, **6b**, **6c**, **6j** e **7g**.

Descritor	3a	3b	3c	6a	6b	6c	6j	7g
Peso molecular (g/mol)	305,32	333,37	413,39	245,23	277,23	279,25	253,26	533,63
Lipofilia (Log P)	1,1935	1,9737	4,1782	2,3003	1,8143	3,0574	3,4909	3,65118
Ligações rotáveis	2	4	4	2	2	2	4	8
Aceitadores de pontes de hidrogénio	5	5	5	4	6	4	3	12
Dadores de pontes de hidrogénio	0	0	0	0	0	0	0	2
Área superficial (Å ²)	125,15	137,88	176,33	103,27	113,49	119,23	109,71	215,83

Em relação à previsão das principais propriedades ADMET (tabela 3.36), no caso da absorção, as 5-(2-nitrobenzilideno)pirimidinas **3a-c** em estudo, o *software* prevê que a solubilidade em água é baixa diminuindo com o aumento da lipofilia.

Em relação à distribuição, é de notar que o *software* indica que há possibilidade que todas as 5-(2-nitrobenzilideno)pirimidinas apresentam uma capacidade intermédia de travessia da BHE e de entrada no SNC, de acordo com os valores referidos por Pires *et al.*⁷

No que diz respeito ao metabolismo, todas as 5-(2-nitrobenzilideno)pirimidinas poderão ser substratos da CYP3A4, no entanto, nenhuma deverá ser substrato da CYP2D6. Os compostos **3a** e **3b** não se apresentam como inibidores dos CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4. Por outro lado, o composto **3c** poderá ter ação inibitória dos CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, contudo, não é inibidor de CYP2D6 e CYP3A4. Estes factos são importantes no que respeita às probabilidades de interações medicamentosas.

Em relação à toxicidade, o *software* prevê que o potencial genotóxico e hepatotóxico seja positivo para todas as 5-(2-nitrobenzilideno)pirimidinas, sendo este um ponto negativo destes compostos, o que poderá ser devido a presença do grupo barbiturato, uma vez que os 2-nitrobenzilidenos derivados de 1,3-dicarbonilo não apresentam toxicidade .

Relativamente aos 2-nitrobenzilidenos **6a**, **6b**, **6c** e **6j**, e no caso da absorção, os derivados **6a** e **6b** deverão ter valores de absorção idênticos, e superiores a **6c** e **6j**, sendo que estes últimos deverão ter comportamento bastante semelhante. No que diz respeito a absorção intestinal, espera-se que o composto **6c** tenha uma absorção superior aos restantes 2-nitrobenzilidenos. Em relação à permeabilidade na pele, não é esperada uma permeabilidade elevada, tal como nas 5-(2-nitrobenzilideno)pirimidinas. Os compostos **6a** e **6b**, não deverão ser substratos da glicoproteína P, contrariamente a **6c** e **6j**. Quanto à inibição da glicoproteína PI e PII, apenas **6b** deverá ter esta atividade, nomeadamente na glicoproteína PI.

Em relação à distribuição, é de notar que todos as 2-nitrobenzilidenos deverão apresentar uma capacidade intermedia de travessia da BHE e de entrada no SNC, tal como as 5-(2-nitrobenzilideno)pirimidinas. Quanto ao metabolismo, todos os compostos poderão ser substratos da CYP3A4, no entanto, não se prevê que sejam substratos da CYP2D6. O composto **6a** pode ser inibidor da CYP1A2. Por outro lado, **6b**, não demonstra nenhuma atividade inibitória nas CYPS em estudo. Relativamente a **6c** e **6j**, apresentam inibição nas CYP1A2, CYP2C19 e CYP2C9, contrariamente ao que ocorre nas CYP2D6 e CYP3A4. Nos estudos de toxicidades, nenhum 2-nitrobenzilideno é hepatotóxico, e apenas **6j** não demonstra genotoxicidade pelo teste de Ames.

Neste contexto, e em comparação com os resultados obtidos na atividade inibitória da XO espera-se que os derivados de 2-nitrobenzilidenos apresentem propriedades ADMET mais promissoras do que os derivados de 5-(2-nitrobenzilideno)pirimidinas.

Tabela 3.36 -Dados computacionais calculados para as propriedades ADMET com base nos modelos do software pkSCM *on-line* para os compostos **3a**, **3b**, **3c**, **6a**, **6b**, **6c**, **6j** e **7g**.

Propriedades	Nome do modelo	Unidades	3a	3b	3c	6a	6b	6c	6j	7g
Absorção	Solubilidade em água	(mol/L)	0,0001	0,00003	0,000004	0,0004	0,0003	0,00003	0,00002	0,00002
	Absorção intestinal (humana)	(%)	70,954	92,875	100	97,22	85,755	98,162	96,184	85,173
	Permeabilidade da pele	(log Kp)	-2,846	-2,846	-2,732	-2,535	-2,769	-2,62	-2,584	-2,737
	Substrato da glicoproteína-P	-	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim
	Inibidor da glicoproteína-P I	-	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim
	Inibidor da glicoproteína-P II	-	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim
Distribuição	Permeabilidade da BHE	(log BHE)	0,588	-0,602	-0,834	-0,256	-0,696	-0,271	-0,304	-0,914
	Permeabilidade do SNC	(log PS)	-2,51	-2,526	-1,949	-2,177	-2,389	-1,944	-1,948	-2,721
Metabolismo	Substrato da CYP2D6	-	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
	Substrato da CYP3A4	-	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	Inibidor da CYP1A2	-	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não
	Inibidor da CYP2C19	-	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim
	Inibidor da CYP2C9	-	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim
	Inibidor da CYP2D6	-	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
	Inibidor da CYP3A4	-	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim
Excreção	Substrato da OCT2 renal	-	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Toxicidade	Teste de AMES	-	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
	Dose máxima tolerada (humanos)	(mg/kg/dia)	0,33	0,30	0,62	0,032	1,38	0,34	1,33	1,08
	Hepatotoxicidade	-	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim
	Sensibilidade na pele	-	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não

Capítulo 4 - Conclusões e Perspetivas Futuras

A partir do objetivo inicial não conseguido deste trabalho de dissertação, que consistia na preparação de novos 2,1-benzisoxazóis por redução parcial de 2-nitrobenzilidenos derivados de outros compostos, que não apenas barbituratos, ampliando a generalidade do método, e tendo em conta que aquando da redução de 2-nitrobenzilidenos derivados de 1,3-dicarbonilos ocorreu a síntese não esperada de *N*-óxidos de quinolina, foram traçados novos objetivos. Desta forma, foi definido como principal objetivo desta dissertação o desenvolvimento de uma nova via sintética de *N*-óxidos de quinolina **8** a partir de 2-nitrobenzilidenos derivados de 1,3-dicarbonilos **6** e de 2-nitrofenilmetilenos derivados de 1,3-dicarbonilos **7**.

Assim, foi realizada a síntese e caracterização estrutural de 3 novos derivados de 5-(2-nitrobenzilideno)pirimidinas **3**, dois novos derivados de 5-(benzisoxazol-3-ilideno)pirimidinas **4**, nove derivados de 2-nitrobenzilidenos **6**, quatro derivados de 2-nitrofenilmetilenos **7**, dos quais um novo, três derivados de *N*-óxidos de quinolina **8** dos quais um igualmente novo e uma quinolina **9**. Apesar de várias tentativas para a obtenção do 2-nitrobenzilideno derivado do composto 1,3-dicarbonilo cíclico **6a**, verificou-se que este apenas foi obtido com a utilização de AlCl_3 como catalisador. Relativamente à redução dos derivados dos 2-nitrobenzilidenos e dos 2-nitrofenilmetilenos, é pertinente o estudo mais aprofundado relativamente aos compostos já sintetizados que contêm heteroátomos, uma vez que da observação das ccf obtidas e dos dados de RMN de ^1H , se conclui ter sido obtida uma mistura de compostos, à exceção do 5-(2-nitrobenzilideno)tiazolidina-2,4-diona **6e**, onde se obteve apenas um produto, embora não tenha sido possível atribuir inequivocamente a sua estrutura.

Quanto à inibição da atividade da XO, verificou-se que as 5-(2-nitrobenzilideno)pirimidinas **3a-c**, os 2-nitrobenzilidenos derivados de 1,3-dicarbonilos **6a-c** e o 2-nitrofenilmetileno derivado 1,3-dicarbonilo **7g**, apresentaram uma boa capacidade inibitória da XO. Além disso, também demonstram baixa citotoxicidade em NHDF, sendo este um aspeto relevante. Apesar da elevada capacidade de inibição enzimática, com IC_{50} calculado de $6,1\mu\text{M}$ e perfil inibitório ao longo do tempo idêntico ao observado para o alopurinol, **7g**, em previsões de estudos *in silico*, viola algumas das regras de Lipinski e dos parâmetros de Veber. Para além disso, espera-se que apresente algumas limitações a nível do perfil ADMET. Assim, torna-se pertinente a realização de alterações estruturais em **7g**, de maneira a estabelecer uma melhor relação estrutura atividade, considerando estes pontos mencionados.

Nos ensaios de proliferação celular (MTT), verificou-se que os 2-nitrobenzilidenos derivados de 1,3-dicarbonilos acíclicos **6g**, **6h**, **6j** e **7b** levaram a percentagens relativas de proliferação baixas em células MCF-7, tal como apresentaram uma baixa inibição no ensaio enzimático.

Nos resultados obtidos para as duas linhas celulares estudadas, destaca-se o (*E*)-3-(nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**6j**), o qual originou uma diminuição da proliferação das células MCF-7 e uma percentagem relativa de proliferação das células NHDF de cerca de 80%, mostrando-se este composto ser bastante promissor no que respeita à atividade anticancerígena.

Futuramente, seria pertinente a realização de um novo *screening* a 30 μM uma vez que, durante este trabalho, só se realizou um *screening* para a linha celular MCF-7, como também um estudo de concentração-resposta para os 2-nitrobenzilidenos derivados de 1,3-dicarbonilos acíclicos **6g**, **6h**, **6j** e **7b**.

Capítulo 5 - Parte Experimental

5.1. Síntese e caracterização estrutural

Todos os reagentes e solventes utilizados encontravam-se analiticamente puros e, sempre que necessário, os solventes foram secos sobre peneiros moleculares 4 Å.

Todas as reações foram seguidas por ccf utilizando placas de alumínio de 0,2 mm revestidas com sílica-gel (Macherey-Nagel 60 G/UV254). O eluente é referido em cada caso, mencionando-se a proporção volumétrica dos vários componentes dos eluentes mistos. Após eluição, as placas foram visualizadas por luz UV ao comprimento de onda de 254 e/ou 365 nm e, quando necessário, utilizaram-se soluções reveladoras adequadas e referidas em cada caso.

Os pontos de fusão (pf) foram determinados para os produtos que se encontravam sob a forma de sólido com tubos capilares abertos, num aparelho de pontos de fusão Büchi B-540 e não foram corrigidos.

Os espectros de infravermelho foram registados num espectrofotómetro Thermo Fisher Scientific Nicolet iS10: smart iTR, obtidos por refletância total atenuada (ATR - do inglês, *Attenuated Total Reflectance*) e *software* Omnic 8.2, segundo as principais definições de: background com 32 scans; amostra com 32 scans; resolução de 4 cm⁻¹, entre 4000 e 600 cm⁻¹. Na descrição dos compostos, os dados obtidos são indicados pela seguinte ordem: frequência máxima da banda de absorção ($\nu_{\text{máx}}$ em cm⁻¹) e atribuição a um grupo de átomos na molécula, no caso das bandas características.

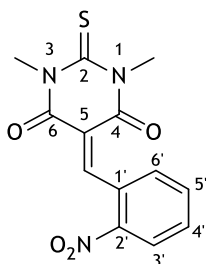
Os espectros de RMN de ¹H e RMN de ¹³C foram efetuados num espectrómetro Brüker Avance III 400 MegaHertz (MHz) (400,13 e 100,62 MHz, respetivamente), sendo processados no software MestReNova 12.0.3. Foram utilizados como solventes o DMSO-*d*₆ ou CDCl₃, sendo ainda utilizados como padrão interno (DMSO-*d*₆, δ = 2,50 ppm e 39,52 ppm ou CDCl₃, δ = 7,26 ppm e 77,16 ppm em RMN de ¹H e ¹³C, respetivamente). Sempre que pertinente, foram realizados espectros de correlação heteronuclear a uma ligação (HSQC - do inglês, *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) e correlação heteronuclear a múltiplas ligações (HMBC - do inglês, *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*). Na descrição dos compostos, os dados obtidos são indicados pela seguinte ordem: para RMN de ¹H - solvente; desvio químico (δ , em ppm); multiplicidade do sinal [s (singleto), d (duplete), dd (duplo duplete), ddd (duplo duplo duplete), dt (duplo triplete), t (triplete), dddd (duplo duplo duplo duplete) ou m (multiplete)]; constante de acoplamento [*J*, em Hertz (Hz)]; intensidade relativa (nH, como número de prótons); atribuição do próton na molécula; para RMN de ¹³C - solvente; desvio químico (δ , em ppm); atribuição do carbono na molécula. Para cada composto sintetizado é apresentada a estrutura a duas dimensões (2D) e a respetiva especificação da linha de entrada molecular simplificada (SMILES - do inglês, *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*), importante para as predições *in silico*. Para tal foi utilizado o software ChemBiodraw 13.0 da ChemBridgeSoft®.

5.1.1. 5-(2-Nitrobenzilideno)pirimidinas 3a-c

Condição reacional A, a mistura de barbituratos-1,3-dissubstituídos **1a-c** (1 mmol) e 2-nitrobenzaldeído (**2**) (1 mmol, 151 mg) em água (5 mL) foi colocada em refluxo durante 2 horas. Após o arrefecimento, o sólido foi filtrado, lavado com água, etanol e éter etílico (10 mL);

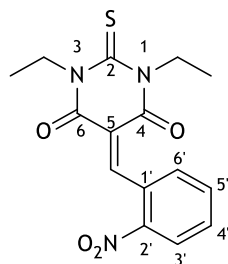
Condição reacional B, a mistura de barbituratos-1,3-dissubstituídos **1a-c** (1 mmol) e 2-nitrobenzaldeído (**2**) (1,5 mmol, 151 mg) em água (5 mL) foi colocada em refluxo durante 2 horas. Após o arrefecimento, o sólido foi filtrado, lavado com água, etanol e éter etílico (10 mL);

5.1.1.1. 1,3-Dimetil-5-(2-nitrobenzilideno)-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1*H*, 5*H*)-diona (**3a**)



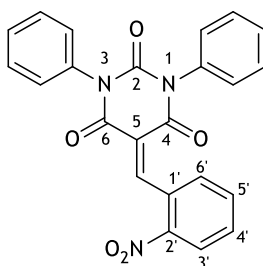
Condição reacional A, a partir do ácido 1,3-dimetiltiobarbitúrico (**1a**) (1 mmol; 172 mg; η 83%; sólido castanho claro; pf 161-162 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3061, 2952, 1705, 1678 (C=O), 1632, 1599, 1570, 1518 (NO₂), 1442, 1359, 1342 (NO₂), 1322, 1244 (C=S), 1171, 1115, 1093, 1046, 859, 787, 730, 672, 631; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8,78 (s, 1H, 5-C_H), 8,28 (d, 1H, J = 8,3 Hz, 3'-ArCH), 7,83 (t, 1H, J = 7,5 Hz, 5'-ArCH), 7,72 (t, 1H, J = 7,9 Hz, 4'-ArCH), 7,60 (d, J = 7,7 Hz, 1H, 6'-ArCH), 3,67 (s, 3H, NCH₃), 3,48 (s, 3H, NCH₃); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 180,92 (2-C=S), 160,10 (C=O), 158,60 (C=O), 155,78 (5-C_H), 146,14 (2'-ArC), 134,00 (5'-ArCH), 131,97 (1'-ArC), 130,36 (4'-ArCH), 130,04 (6'-ArCH), 124,12 (3'-ArCH), 120,47 (5-C), 35,54 (N-CH₃), 34,96 (N-CH₃); SMILES S=C(N(C)C(/C1=C/C2=C([N+])([O-])=O)C=CC=C2)=O)N(C)C1=O.

5.1.1.2. 1,3-Dietil-5-(2-nitrobenzilideno)pirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (3b)



Condição reacional B, a partir do ácido 1,3-dietiltiobarbitúrico (**1b**) (1 mmol; 200 mg); η 20%; sólido amarelo; pf 124-125 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 2984, 2935, 2873, 1694, 1677 (C=O), 1634, 1607, 1571, 1524 (NO_2), 1480, 1446, 1430, 1380, 1363, 1343 (NO_2), 1285 (C=S), 1236, 1203, 1164, 1118, 1102, 1081, 1064, 1003, 904, 853, 786, 741, 714, 689, 672, 653, 625; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 8,74 (s, 1H, 5-C $\underline{\text{CH}}$), 8,27 (d, 1H, J = 8,3 Hz, 3'-Ar $\underline{\text{CH}}$), 7,81 (t, 1H, J = 7,6 Hz, 5'-Ar $\underline{\text{CH}}$), 7,70 (t, 1H, J = 7,9 Hz, 4'-Ar $\underline{\text{CH}}$), 7,62 (d, 1H, J = 7,7 Hz, 6'-Ar $\underline{\text{CH}}$), 4,42 (q, 2H, J = 7,0 Hz, NCH_2CH_3), 4,24 (q, 2H, J = 7,0 Hz, NCH_2CH_3), 1,24 (t, 3H, J = 6,9 Hz, NCH_2CH_3), 1,09 (t, 3H, J = 6,9 Hz, 3H, NCH_2CH_3); RMN de ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 179,42 ($\underline{\text{C}}=\text{S}$), 159,46 ($\underline{\text{C}}=\text{O}$), 158,04 ($\underline{\text{C}}=\text{O}$), 155,38 (5-C $\underline{\text{CH}}$), 146,21 (2'-Ar $\underline{\text{C}}$), 134,00 (5'-Ar $\underline{\text{CH}}$), 131,92 (1'-Ar $\underline{\text{C}}$), 130,38 (4'-Ar $\underline{\text{CH}}$), 130,14 (6'-Ar $\underline{\text{CH}}$), 124,13 (3'-Ar $\underline{\text{CH}}$), 120,64 (5- $\underline{\text{C}}$), 43,32 (NCH_2CH_3), 42,75 (NCH_2CH_3), 12,15 (NCH_2CH_3), 11,99 (NCH_2CH_3); SMILES S=C(N(CC)C)/C1=C/C2=C([N+])([O-])C=CC=C2)O)N(CC)C1=O.

5.1.1.3. 5-(2-Nitrobenzilideno)-1,3-difenilpirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (3c)



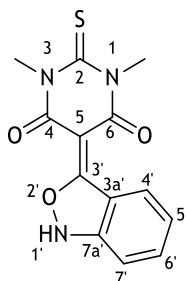
Condição reacional A, a partir do ácido 1,3-difenilbarbitúrico (**1c**) (1 mmol; 280 mg); η 82%; sólido branco; pf 239-240 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3028, 1746, 1681 (C=O), 1627, 1608, 1574, 1519 (NO_2), 1491, 1404, 1355 (NO_2), 1325, 1247, 1210, 1185, 1169, 942, 794, 762, 750, 735, 709, 695, 671, 558, 545; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 8,82 (s, 1H, 5-C $\underline{\text{CH}}$), 8,25 (dd, 1H, J = 8,2, 1,2 Hz, 3'-Ar $\underline{\text{CH}}$), 7,82 (td, 1H, J = 7,6, 1,2 Hz, 5'-Ar $\underline{\text{CH}}$), 7,71-7,61 (m, 2H, Ar $\underline{\text{CH}}$), 7,57-

7,50 (m, 2H, (ArCH)₂), 7,49-7,36 (m, 6H, (ArCH)₆), 7,34-7,27 (m, 2H, (ArCH)₂); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 161,86 (C=O), 160,63 (C=O), 154,56 (5-C_{CH}), 151,05 (2-CO), 146,67 (2'-ArC), 135,98 (ArC), 135,62 (ArC), 134,49 (5'-ArCH), 132,36 (1'-ArC), 130,69 (4'-ArCH), 130,54 (6'-ArCH), 129,42 (ArCH), 129,32 (ArCH), 129,25 (ArCH), 129,02 (ArCH), 128,86 (ArCH), 124,58 (3'-ArCH), 121,45 (5-C); SMILES O=C(N(C1=CC=CC=C1)C(/C2=C/C3=C([N+])([O-])=O)C=CC=C3)=O)N(C4=CC=CC=C4)C2=O.

5.1.2. 5-(Benzisoxazol-3-ilideno)pirimidinas 4a-b

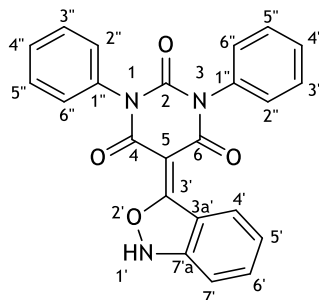
Condição reacional A, à solução de 5-(2-nitrobenzilideno)pirimidinas (1 mmol) e cloreto de estanho di-hidratado (1 mmol, 225 mg) em TFH (20 mL), foi adicionado ácido clorídrico concentrado (10 mmol; 974 mg), e a mistura foi colocada em refluxo durante 15 minutos. Após arrefecimento, o sólido foi filtrado e lavado com éter etílico para dar as seguintes 5-(benzisoxazol-3-ilideno)pirimidinas:

5.1.2.1. 5-(Benzo[*c*]isoxazol-3(1*H*)-ilideno)-1,3-dimetil-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1*H*, 5*H*)-diona (4a)



Condição reacional A, a partir 1,3-dimetil-5-(2-nitrobenzilideno)-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1*H*, 5*H*)-diona (**3a**) (1 mmol; 305 mg); η 84%; sólido amarelo; ; pf 218-219 °C; FTIR ν_{máx} (cm⁻¹) 2947, 2788, 2718, 1667, 1606 (C=O), 1566, 1520 (NO₂), 1478, 1447 (NO₂), 1367, 1310, 1246 (C=S), 1226, 1179, 1138, 1100, 1068, 929, 899, 778, 755, 740, 680, 635; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7,77 (dt, 1H, *J* = 8,8, 1,1 Hz, 4'-ArCH), 7,38 (dt, 1H, *J* = 9,0, 1,0 Hz, 7'-ArCH), 7,24 (ddd, 1H, *J* = 9,0, 6,3, 1,1 Hz, 6'-ArCH), 6,77 (ddd, 1H, *J* = 8,8, 6,3, 0,9 Hz, 5'-ArCH), 3,62 (s, 6H, 1-, 3-NCH₃); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 177,12 (2-C=S), 166,53 (3'-C), 159,21 (4- e 6-C=O), 156,19 (7a'-ArC), 130,42 (6'-ArCH), 125,06 (4'-ArCH), 119,77 (5'-ArCH), 114,78 (3a'-C), 113,32 (7'-ArCH), 84,69 (5-C), 34,86 (1,3-NCH₃); SMILES S=C(N(C)C(/C1=C2ONC3=C\2C=CC=C3)=O)N(C)C1=O.

5.1.2.2. 5-(Benzo[c]isoxazol-3(1H)-ilideno)-1,3-difenilpirimidina-2,4,6(1H, 3H, 5H) -triona (4b)



Condição reacional A, a partir do 5-(2-nitrobenzilideno)-1,3-difenil-2-tioxodihidropirimidina-4,6-(1H, 5H)-diona (**3c**) (1 mmol; 413 mg); η 70%; sólido amarelo; ; pf 264-265 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3133, 2945, 2784, 2708, 1719, 1656 (C=O), 1609, 1474 (NO_2), 1454, 1419, 1356 (NO_2), 1325, 1293, 1268, 1246, 1165, 1088, 1073, 979, 903, 804, 785, 762, 750, 737, 696, 633, 594, 583; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 7,83 (d, 1H, J = 8,8 Hz, 4'-ArCH), 7,42 (dd, 4H, J = 8,3, 6,9 Hz, 3''- 5''-ArCH), 7,36-7,26 (m, 7H, 7'-, 2''-, 4''-6''-ArCH), 7,21 (dd, 1H, J = 8,9, 6,3 Hz, 6'-ArCH), 6,70 (dd, 1H, J = 8,8, 6,2 Hz, 5'-ArCH); SMILES O=C(N(C1=CC=CC=C1)C(/C2=C3ONC4=C\3C=CC=C4)=O)N(C5=CC=CC=C5)C2=O.

5.1.3. 2-Nitrobenzilidenos derivados de 1,3-dicarbonilos cíclicos 6

Sintetizados a partir da 1,3-dicarbonilos **5** correspondente e 2-nitrobenzaldeído (**2**) pelas condições reacionais **A-D** abaixo apresentadas. As reações foram seguidas por ccf (DCM/1% MeOH). Após o seu término, os produtos foram isolados por filtração da mistura obtida seguida de lavagem dos mesmos com hexano.

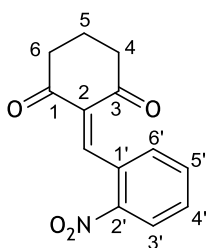
Condição reacional A: a uma suspensão de 1,3-dicetona (1mmol); em 1,6 mL de DCM/hexano (1:2) adicionou-se cloreto de alumínio (0,2 mmol; 27 mg). A mistura deixou-se sob agitação constante e à temperatura ambiente durante 5 minutos. De seguida, adicionou-se uma solução de 2-nitrobenzaldeído (**2**) (2 mmol; 302 mg) em 3,6 mL de DCM/hexano (3:5) deixando-se reagir durante 8 dias.

Condição reacional B: a uma suspensão de 1,3-dicetona (1mmol); em 1,6 mL de DCM/hexano (1:2); adicionou-se cloreto de alumínio (0,2 mmol; 27 mg) e deixou-se sob agitação constante e à temperatura ambiente durante 5 minutos. De seguida, adicionou-se uma solução de 2-nitrobenzaldeído (**2**) (1 mmol; 302 mg) em 3,6 mL de DCM/ hexano (3:5) deixando-se reagir durante 8 dias.

Condição reacional C: uma mistura de 1,3-dicetona (1 mmol) e 2-nitrobenzaldeído (**2**) (1 mmol; 151 mg) em água (3 mL) foi colocada em refluxo deixando-se reagir durante 8 horas.

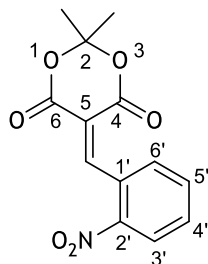
Condição reacional D: uma mistura de 1,3-dicetona (1 mmol) e 2-nitrobenzaldeído (**2**) (1 mmol; 151 mg) em metanol (3 mL), sob peneiros moleculares ativados, foi colocada em refluxo deixando-se reagir durante 8 horas.

5.1.3.1. 2-(2'-Nitrobenzilideno) ciclohexan-1,3-diona (**6a**)



Condição Reacional A, a partir de ciclohexan-1,3-diona (**5a**) (1 mmol; 112 mg); η 93%; sólido amarelo; pf 149-150 °C (lit. 204-206 °C)⁶⁸; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3029, 2960, 2892, 1706, 1663 (C=O), 1587, 1566, 1516 (NO₂), 1463, 1432, 1418, 1334 (NO₂), 1308, 1264, 1240, 1209, 1179, 1148, 1111, 1080, 989, 907, 857, 799, 754, 733, 699, 676, 599, 545; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8,21 (d, 1H, J = 8,2 Hz, 3'-ArCH), 8,17 (s, 1H, 2-CCH), 7,74 (t, 1H, J = 7,6 Hz, 5'-ArCH), 7,64 (t, 1H, J = 7,8 Hz, 4'-ArCH), 7,44 (d, 1H, J = 7,7 Hz, 6'-ArCH), 2,68 (t, 2H, J = 6,5 Hz, CH₂), 2,58 (t, 2H, J = 6,5 Hz, CH₂), 1,99 (p, 2H, J = 6,4 Hz, 5-CH₂); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 198,05 (C=O), 197,55 (C=O), 146,87 (5-CCH), 146,76 (2'-ArC), 135,69 (5-C), 133,95 (5'-ArCH), 132,74 (1'-ArC), 130,12 (4'-ArCH), 129,77 (6'-ArCH), 124,23 (3'-ArCH), 38,34 ((CH₂)₂); 17,06 (CH₃); SMILES O=C1/C(C(CCC1)=O)=C\C2=C([N+])([O-])=O)C=CC=C2.

5.1.3.2. 2,2-Dimetil-5-(2-nitrobenzilideno) -1,3-dioxan-4,6-diona (6b)

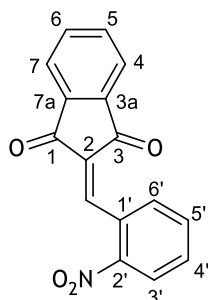


Condição reacional B, a partir de 2,2-dimetil-1,3-dioxan-4,6-diona (**5b**) (1mmol, 144mg); η 92%; sólido beije; pf 105-106 °C (lit. 116-118 °C)⁶⁹; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3052, 1770, 1740 (C=O), 1729 (C=O), 1634, 1604, 1571, 1512 (NO₂), 1389, 1381, 1336 (NO₂), 1288, 1256, 1220, 1199 (C-O), 1119, 1034, 1001, 936, 925, 865, 794, 765, 726, 692, 670, 599; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8,85 (s, 1H, 5-C $\underline{\text{CH}}$), 8,28 (d, 1H, *J* = 8,3 Hz, 3'-Ar $\underline{\text{CH}}$), 7,85 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz, 5'-Ar $\underline{\text{CH}}$), 7,74 (t, 1H, *J* = 7,8 Hz, 4'-Ar $\underline{\text{CH}}$), 7,62 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, 6'-Ar $\underline{\text{CH}}$), 1,78 (s, 6H, 2-C(CH₃)₂); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 161,28 (C=O), 159,05 (C=O), 156,18 (5-C $\underline{\text{CH}}$), 146,34 (2'-Ar $\underline{\text{C}}$), 134,25 (5'-Ar $\underline{\text{CH}}$), 131,01 (1'-Ar $\underline{\text{C}}$), 130,38 (4'-Ar $\underline{\text{CH}}$), 130,34 (6'-Ar $\underline{\text{CH}}$), 124,43 (3'-Ar $\underline{\text{CH}}$), 117,44 (5-C $\underline{\text{C}}$), 105,38 (2-C $\underline{\text{C}}$), 27,23 (2-C(CH₃)₂); SMILES O=C1/C(C(OC(C)(C)O1)=O)=C\C2=C([N+])([O-])=O)C=CC=C2.

Condição reacional C: a partir de 2,2-dimetil-1,3-dioxan-4,6-diona (**5b**) (1mmol); η 38; sólido beije.

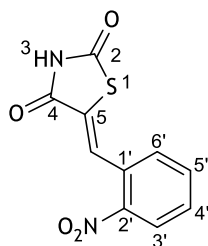
Condição reacional D: a partir de 2,2-dimetil-1,3-dioxan-4,6-diona (**5b**) (1mmol); η 51; sólido beije.

5.1.3.3. 2-(2-Nitrobenzilideno)-1*H*-inden-1,3(2*H*)-diona (6c)



A suspensão de 2-nitrobenzaldeído (**2**) (0,75 mmol; 115 mg) foi colocada em água (5 ml) à temperatura ambiente durante 15 minutos. À suspensão obtida, adicionou-se a indandiona (**5c**) (0,68 mmol, 99 mg) e deixou-se reagir à temperatura ambiente durante 15 horas. Posteriormente, a mistura reacional foi colocada num banho de parafina a 80°C durante 4 horas. A reação foi seguida por ccf (eluente: DCM/hexano (1:1)). O sólido precipitado foi filtrado e lavado com etanol; η 77%; sólido amarelo pf 178-179 °C (lit. (192-194 °C)⁷⁰; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3399, 3079, 1732, 1690 (C=O), 1637, 1588, 1568, 1518 (NO₂), 1442, 1340 (NO₂), 1309, 1289, 1234, 1203, 1093, 992, 857, 786, 749, 737, 712, 692, 663, 606, 576, 533; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8,27 (dd, 1H, J = 8,2, 1,3 Hz, ArCH), 8,24 (s, 1H, 2-CCH), 8,08 - 8,04 (m, 1H, ArCH), 8,01 - 7,98 (m, 2H, ArCH), 7,96 - 7,92 (m, 2H, ArCH), 7,85 (td, 1H, J = 7,5, 1,3 Hz, ArCH), 7,78 (td, 1H, J = 7,8, 1,6 Hz, ArCH); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 188,79, 187,82, 147,85, 141,83, 141,30, 140,05, 136,46, 136,35, 133,58, 132,75, 131,54, 130,59, 128,75, 124,62, 123,42, 123,34; SMILES O=C(C1=CC=CC=C1C2=O)C2=C/C3=C([N+])([O-])=O)C=CC=C3.

5.1.3.4. (Z)-5-(2-nitrobenzilideno)tiazolidin-2,4-diona (6e)

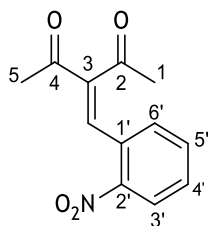


A mistura de 2-nitrobenzaldeído (**2**) (0,66 mmol; 100 mg), 2,4-tiazolidienediona (**5e**) (0,71 mmol; 83 mg) e acetato de sódio (1,22 mmol; 100 mg) em ácido acético (4,37 mmol; 263 mg; 250 μ L) e anidrido acético (0,88 mmol; 90 mg; 83 μ L) foi colocada a 80 °C durante 48 horas. A reação foi seguida por ccf (eluente: DCM/5% MeOH). À mistura obtida adicionou-se água. O sólido precipitado foi filtrado e lavado com etanol a quente (2 \times 2 mL). O filtrado foi tratado com carvão ativado 5 minutos a refluxo. A mistura obtida foi filtrada a quente, o etanol foi evaporado à secura e o sólido obtido foi seco na estufa a uma temperatura de 50°C; η 52%; sólido cor de rosa; pf 190-191 °C (lit. 195-196°C)⁷³; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3358 (N-H), 3142, 3052, 2768, 1735 (C=O), 1713 (C=O), 1678, 1609, 1571, 1518 (NO₂), 1475, 1440, 1345, 1314 (NO₂), 1293, 1214, 1163, 1010, 870, 839, 784, 751, 690, 668, 632, 610, 565, 526; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 12,77 (s, 1H, NH), 8,19 (dd, 1H, *J* = 8,5, 1,3 Hz, ArCH), 7,97 (s, 1H, 5-CCH), 7,88 (td, 1H, *J* = 7,6, 1,3 Hz, ArCH), 7,74 - 7,68 (m, 2H, (ArCH)₂); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 168,10, 167,61, 147,96, 134,46, 130,88, 129,24, 129,12, 129,04, 127,70, 125,39; SMILES O=C(NC(=O)SC1=C/C2=C([N+])([O-])=O)C=CC=C2.

5.1.4. 2-Nitrobenzilidenos derivados de 1,3-dicarbonilos acíclicos 6g-i

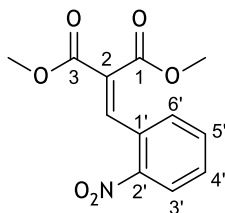
Condição reacional A, a mistura de 1,3-dicarbonilos **5g-i** (1mmol) e 2-nitrobenzaldeído (**2**) (1mmol, 151 mg) em piperidina (0,1 mmol; 8,5 mg), ácido acético (0,2 mmol; 12 mg) e benzeno (758 μ L) foi colocada em refluxo durante 20 horas. A mistura reacional foi lavada com brine (2 \times 5 mL). Seguidamente, realizaram-se extrações sucessivas com benzeno. As fases orgânicas foram combinadas e secas sob Na₂SO₄. O solvente foi evaporado obtendo-se o produto puro.

5.1.4.1. 3-(2-Nitrobenzilideno) pentan-2,4-diona (6g)



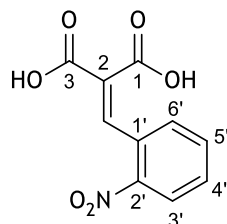
Condição reacional A, a partir da acetilacetona (**5g**) (1mmol, 100mg); óleo; η 83%; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3074, 2923, 2858, 1695, 1667 ($\text{C}=\text{O}$), 1604, 1571, 1520 (NO_2), 1424, 1342 (NO_2), 1240, 1210, 1175, 1145, 974, 861, 824, 789, 752, 709, 672, 631, 600; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 -d) δ (ppm) 8,23 (dd, 1H, $J = 8,1, 1,4$ Hz, ArCH), 7,91 (s, 1H, 3-CC $\underline{\text{H}}$), 7,66 (td, 1H, $J = 7,5, 1,4$ Hz, ArCH), 7,59 (dddd, 1H, $J = 8,1, 7,5, 1,5, 0,6$ Hz, ArCH), 7,39 (dt, 1H, $J = 7,5, 1,2$ Hz, ArCH), 2,48 (s, 3H, CCOCH $\underline{\text{H}}$), 2,12 (s, 3H, CCOCH $\underline{\text{H}}$); RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3 -d) δ (ppm) 202,92 ($\underline{\text{C}}=\text{O}$), 196,43 ($\underline{\text{C}}=\text{O}$), 147,14, 144,32, 137,88, 134,23, 131,32, 130,65, 130,05, 125,37, 31,84 (3-CCOCH $\underline{\text{H}}$), 26,89 (3-CCOCH $\underline{\text{H}}$); SMILES CC(=O)C(=O)C=C(C1=CC([N+](=O)[O-])=CC=C1)C=CC(=O)C.

5.1.4.2. Dimetil- 2-(2-nitrobenzilideno) malonato (6h)



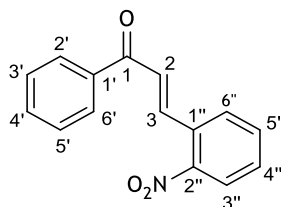
Condição reacional A, a partir de dimetil malonato (**6h**) (1mmol, 132mg); óleo; η 97%; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3005, 2953, 2982, 1717 ($\text{C}=\text{O}$), 1628, 1606, 1571, 1519 (NO_2), 1451, 1436, 1365, 1340 (NO_2), 1263, 1223 ($\text{C}-\text{O}$), 1203, 1147, 1069, 976, 938, 920, 864, 842, 792, 763, 743, 729, 696, 667, 619, 588; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 -d) δ (ppm) 8,22 (dt, 2H, $J = 4,4, 3,8, 1,4$ Hz, ArCH e 2-CCH), 7,65 (td, 1H, $J = 7,6, 1,4$ Hz, ArCH), 7,57 (dddd, 1H, $J = 8,2, 7,4, 1,6, 0,6$ Hz, ArCH), 7,41 (dt, 1H, $J = 7,6, 1,3$ Hz, ArCH), 3,88 (s, 3H, 2-CCOOCH $\underline{\text{H}}$), 3,61 (s, 3H, 2-CCOOCH $\underline{\text{H}}$); RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3 -d) δ (ppm) 167,09 ($\text{C}=\text{O}$), 165,45 ($\text{C}=\text{O}$), 163,86, 141,93, 133,97, 130,49, 130,45, 130,10, 128,56, 125,25, 53,05 (2-CCOOCH $\underline{\text{H}}$), 52,62 (2-CCOOCH $\underline{\text{H}}$); SIMILES COC(=O)C(=O)C=C(C1=CC([N+](=O)[O-])=CC=C1)C=CC(=O)OC.

5.1.4.3. 2-(2-Nitrobenzilideno) ácido malónico (6i)



Condição reacional A, a partir de ácido malónico (**5i**) (1mmol, 104 mg); O sólido foi filtrado e lavado com *n*-hexano (3 × 2 mL) ; η 91%; sólido amarelo claro; pf 140-141 °C (lit. (151-154 °C)⁷⁵; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3400 a 2000 (O-H), 2849, 1710, 1686 (C=O), 1632, 1606, 1571, 1519 (NO₂), 1478, 1417, 1334, 1249 (NO₂), 1205, 1076, 918, 873, 8412, 824, 794, 747, 703, 690, 665, 615; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 13,52 (s, 2H, 2 x OH), 8,19 (dd, 1H, J = 8,3, 1,2 Hz, 3'-ArCH), 7,94 (s, 1H, 2-CCH), 7,81 (td, 1H, J = 7,6, 1,3 Hz, 5'-ArCH), 7,67 (td, 1H, J = 7,8, 1,5 Hz, 4'-ArCH), 7,52 (dt, 1H, J = 7,7, 1,1 Hz, 6'-ArCH); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 166,62 (C=O), 165,21 (C=O), 147,12, 138,75, 134,28, 130,53, 130,50, 130,42, 130,04 (6'-ArCH), 124,86 (3'-ArCH); SMILES OC(/C(C(O)=O)=C/C1=C([N+])([O-])=O)C=CC=C1)=O.

5.1.4.4. (E)-3-(2-nitrofenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (6j)

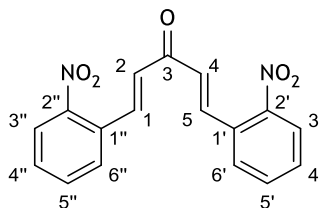


A mistura de acetofenona (**5j**) (4 mmol; 490 mg), 2-nitrobenzaldeído (**2**) (4mmol, 623 mg) e NaOH (0,4 mmol; 16 mg) em EtOH (6 mL) foi colocada a reagir à temperatura ambiente durante 5 dias. A reação foi seguida por ccf (eluente: DCM/1% MeOH). Posteriormente, adicionou-se gota a gota e sob agitação constante H₂SO₄ (155 μ L). A mistura reacional foi aquecida num banho de parafina a 80°C durante 2 horas. O sólido precipitado foi filtrado e lavado com água (3×2 mL); η 54%; cristais amarelos em forma de agulha; pf 118-119 °C (lit. 120-122 °C)⁷⁷; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3061, 2844, 1664, 1603 (C=O), 1569, 1509 (NO₂), 1445, 1338 (NO₂), 1289, 1276, 1214, 1201, 1180, 1144, 1013, 964, 858, 791, 779, 739, 679, 653, 583; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8,21 (dd, 1H, J = 7,9, 1,4 Hz), 8,19 - 8,16 (m, 2H), 8,10 (dd, 1H, J = 8,1, 1,3 Hz), 8,00 (d, 1H, J = 15,5 Hz), 7,91 (d, 1H, J = 15,5 Hz), 7,84 (td, 1H, J = 7,5, 1,2 Hz), 7,74 - 7,68 (m, 2H), 7,63 - 7,57 (m, 2H); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 189,18, 148,84, 138,66,

137,08, 133,85, 133,61, 131,15, 129,80, 129,58, 128,96, 128,79, 126,45, 124,78; SMILES
O=C(/C=C/C1=C([N+])([O-])=O)C=CC=C1)C2=CC=CC=C2.

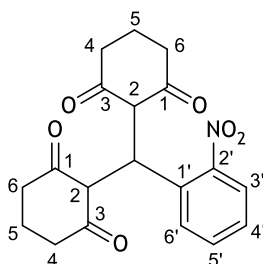
5.1.5. 2-Nitrofenilmetilenos derivados de 1,3-dicarbonilos 7

5.1.5.1. (1E,4E)-1,5-bis(2-nitrofenil)penta-1,4-dien-3-ona (7b)



A mistura de acetona (**5k**) (3,3 mmol; 198 mg), 2-nitrobenzaldeído (**2**) (1mmol, 151 mg) e NaOH (0,1 mmol; 4mg) em EtOH (1,5 mL) foi colocada a reagir à temperatura ambiente durante 5 dias. A reação foi seguida por ccf (eluente: DCM/1% MeOH). Posteriormente, adicionou-se gota a gota e sob agitação constante H₂SO₄ (125 µl). A mistura reacional foi aquecida num banho de parafina a 80°C durante 2 horas. O sólido precipitado foi filtrado e lavado com água (3×2 mL); η 86%; sólido verde escuro; pf 170,5-171 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3038, 1673, 1621 (C=O), 1605, 1590, 1568, 1507 (NO₂), 1442, 1337 (NO₂), 1296, 1277, 1204, 1168, 1106, 989, 975, 895, 862, 790, 783, 746, 707, 673, 654, 572; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8,11 (dd, 1H, *J* = 8,1, 1,3 Hz), 8,05 (d, 2H, *J* = 15,9 Hz), 8,01 (dd, 1H, *J* = 7,9, 1,4 Hz), 7,84 (td, 1H, *J* = 7,6, 1,3 Hz), 7,71 (ddd, 1H, *J* = 8,6, 7,4, 1,4 Hz), 7,30 (d, 2H, *J* = 15,8 Hz); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 188,11, 148,66, 138,61, 133,98, 131,17, 129,87, 129,36, 129,31, 124,86; SMILES
O=C(/C=C/C1=CC=CC=C1[N+])([O-])=O)/C=C/C2=C([N+])([O-])=O)C=CC=C2.

5.1.5.2. 2,2'-((2-Nitrofenil)metileno)bis(ciclohexan-1,3-diona) (7c)



Sintetizado a partir de ciclohexa-1,3-diona (**5a**) e 2-nitrobenzaldeído (**2**) pelas condições reacionais **A** a **G**. A evolução da reação foi seguida por ccf (DCM/1% MeOH), obtendo -se os resultados abaixo descritos para cada condição reacional. FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3079, 2967, 2944, 2897, 2872, 1677, 1660 (C=O), 1652 (C=O), 1618, 1516 (NO₂), 1456, 1356 (NO₂), 1335, 1237, 1120, 1174, 1128, 1013, 961, 911, 862, 822, 786, 753, 720, 698, 640, 613, 562, 537; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7,77 (dt, 1H, *J* = 7,7, 1,2 Hz), 7,55 (ddd, 1H, *J* = 8,3, 7,2, 1,4 Hz), 7,37 - 7,31 (m, 2H), 5,39 (s, 1H), 2,68 - 2,55 (m, 4H), 2,37 - 2,11 (m, 5H), 2,02 - 1,74 (m, 4H); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 196,23 (C=O), 165,12 (C=O), 149,13 (ArC), 138,56 (ArC), 132,86 (ArCH), 130,62 (ArCH), 127,27 (ArCH), 124,00 (ArCH), 114,48 (2-C), 36,40 (CH₂), 27,29 (2-CCH), 26,56 (CH₂), 19,78 ((5-CH₂)₂); SMILES O=C1C(C(C2C(CCCC2=O)=O)C3=CC=CC=C3[N+](=[O-])=O)C(CCC1)=O.

Condições reacionais A: A mistura de ciclohexan-1,3-diona (1 mmol, 112 mg) refluxo durante 6h. O sólido precipitado foi filtrado e lavado com etanol e éter etílico (2×5 mL) (1:1). A reação foi seguida por ccf (eluente: DCM/1% MeOH); η 89%; sólido branco.

Condições reacionais B: A mistura de ciclohexan-1,3-diona (1 mmol, 112 mg) e 2-nitrobenzaldeído (1mmol, 151 mg) em MeOH (5 mL), foi colocada em refluxo durante 2h. O sólido precipitado foi filtrado e lavado com etanol e éter etílico (2×5 mL) (1:1). A reação foi seguida por ccf (eluente: DCM/1% MeOH); η 68%; sólido branco.

Condições reacionais C: A mistura de ciclohexan-1,3-diona correspondente (1 mmol; 112 mg) e 2-nitrobenzaldeído (1 mmol; 151 mg) em MeOH (5 mL), sob peneiros moleculares, foi colocada em refluxo durante 3h. O sólido precipitado foi filtrado e lavado com etanol e éter etílico (2×5 mL) (1:1). A reação foi seguida por ccf (eluente: DCM/1% MeOH); η 49%; sólido branco.

Condições reacionais D: A mistura de ciclohexan-1,3-diona correspondente (1mmol; 112 mg) e 2-nitrobenzaldeído (1 mmol; 151 mg) em MeOH (5 mL), sob peneiros moleculares, foi colocada à temperatura ambiente durante 20h. A mistura reacional foi evaporada à secura e

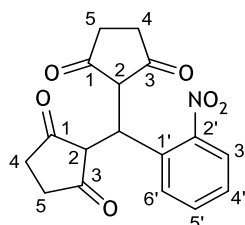
posteriormente o precipitado foi filtrado e lavado com acetato de etilo frio (2×5 mL); η 83%; sólido branco.

Condições reacionais E: A mistura de ciclohexan-1,3-diona correspondente (1mmol; 112 mg) e 2-nitrobenzaldeído (1 mmol; 151 mg) em éter seco (5 mL), sob peneiros moleculares, foi colocada à temperatura ambiente durante 4 dias. A mistura reacional foi evaporada à secar e posteriormente o precipitado foi filtrado e lavado com hexano (3×6 mL); a reação foi seguida por ccf (eluente: DCM/1% MeOH); η 85%; sólido branco.

Condições reacionais F: A mistura de ciclohexan-1,3-diona correspondente (1mmol; 112 mg) e 2-nitrobenzaldeído (1 mmol; 151 mg) em éter seco (5 mL) e Et_3N (1 mmol), sob peneiros moleculares, foi colocada à temperatura ambiente durante 1 dia. O sólido precipitado foi filtrado e lavado com hexano (3×6 mL); a reação foi seguida por ccf (eluente: DCM/1% MeOH); η 85%; sólido branco.

Condições reacionais G: A mistura de ciclohexan-1,3-diona correspondente (2 mmol; 224 mg) e 2-nitrobenzaldeído (1 mmol; 151 mg) em etanol (1 mL) foi colocada em refluxo durante 6 dias. O sólido precipitado foi filtrado e lavado com hexano (3×6 mL); a reação foi seguida por ccf (eluente: DCM/1% MeOH); η 70%; sólido branco.

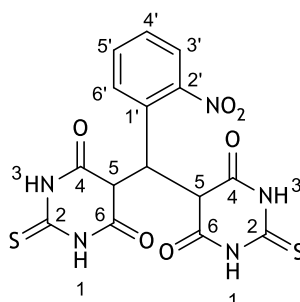
5.1.5.3. 2,2'-((2-Nitrofenil)metileno)bis(ciclopentan-1,3-diona) (7d)



A suspensão de ciclopent-1,3-diona (**5f**) (1,3 mmol; 131 mg) e 2-nitrobenzaldeído (**2**) (0,66 mmol; 101 mg) em água (3 mL) foi colocada a reagir à temperatura ambiente durante 19 horas. A reação foi seguida por ccf (eluente: DCM/10% MeOH). O sólido precipitado foi filtrado e lavado com hexano (4×8 mL); η 47%; sólido branco; pf 234-235 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3074, 2937, 2507, 1648, 1633, 1519 (C=O), 1473, 1425, 1410, 1310, 1344, 1286 (NO_2), 1247, 1221, 1168, 1102, 1057, 998, 936, 861, 842, 788, 764, 725, 690, 662, 584, 554; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 7,64 (dd, 1H, $J = 7,9, 1,4$ Hz), 7,52 (td, 1H, $J = 7,7, 1,4$ Hz), 7,39 (td, 1H, $J = 7,7, 1,4$ Hz), 7,31 (dt, 1H, $J = 7,8, 1,2$ Hz), 5,31 (s, 1H), 2,45 - 2,33 (m, 8H); RMN de ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 196,23, 165,12, 149,13, 138,56, 132,86, 130,62, 127,27, 124,00, 114,48,

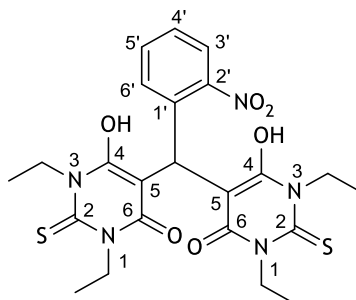
36,40, 27,29, 26,56, 19,78; SMILES O=C(CC1)C(C(C2C(CCC2=O)=O)C3=CC=CC=C3[N+])([O-])=O)C1=O.

5.1.5.4. 5,5'-((2-Nitrofenil) metileno) bis(2-tioxodihidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona) (7f)



A mistura de ácido tio barbitúrico (**1d**) (0,88mmol; 102 mg) e 2-nitrobenzaldeído (**2**) (0,44 mmol; 67 mg) em etanol (2 mL), foi colocada em refluxo durante 5 horas e 30 minutos. A reação foi seguida por ccf (eluente: DCM/15% MeOH) O sólido precipitado foi filtrado e lavado com etanol e éter de petróleo (1:1) (3×6 mL); η 48%; sólido amarelo; pf 230-231 dec.; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3084, 1621 (C=O), 1553, 1519 (NO_2), 1443, 1348 (NO_2), 1325, 1298, 1239, 1204, 1130 (C-S), 1004, 849, 780, 723, 687, 652, 599, 541; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 11,62 (s, 4H, NH), 7,53 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, ArCH), 7,47 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz, ArCH), 7,33 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz, ArCH), 6,11 (s, 1H, 5- CCH); RMN de ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 173,11, 162,59, 149,75, 135,60, 131,14, 129,45, 126,66, 123,61, 94,75, 28,8; SMILES S=C(NC(C1C(C2C(NC(NC2=O)=S)=O)C3=C([N+])([O-])=O)C=CC=C3)=O)NC1=O.

5.1.5.5. 5,5'-((2-Nitrofenil)metileno)bis(1,3-dietil-2-tioxodihidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona) (7g)



A mistura de ácido 1,3-dietiltiobarbitúrico (**1b**) (1,5 mmol, 300 mg) e 2-nitrobenzaldeído (**2**) (2,25 mmol, 340 mg) em etanol (20 mL), foi colocada em refluxo durante 2 horas. O sólido precipitado foi filtrado e lavado com etanol e éter etílico (1 x 10 mL); η 60 %; sólido cor de rosa; pf 176- 177 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3079, 2977, 2932, 2872, 2458, 1606 (C=O), 1525 (NO_2), 1436, 1373 (NO_2) 1265 (C=S), 1222, 1187, 1108, 914, 849, 826, 804, 777, 746, 733, 678, 658, 615; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 8,23 (s, 2H, OH), 7,50 (ddd, 2H, $J = 16,4, 7,8, 4,1$ Hz, (ArCH)₂), 7,33 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz, ArCH), 7,19 (dd, 1H, $J = 7,8, 1,4$ Hz, ArCH), 6,36 (s, 1H, 5-CCH), 4,49-4,29 (m, 8H, NCH_2CH_3), 1,14 (t, 12H, $J = 6,9$, NCH_2CH_3); RMN de ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 173,96 ($\text{C}=\text{S}$), 160,43, 149,58, 135,06, 130,93, 128,84, 126,41, 123,26, 94,56, 42,45, 31,34 (NCH_2CH_3), 11,91 (NCH_2CH_3); SMILES S=C1N(CC)C(O)=C(C(C(C(N2CC)=O)=C(O)N(CC)C2=S)C3=C([N+])([O-])=O)C=CC=C3)C(N1CC)=O.

5.1.6. N-óxidos de quinolina 8a-c

A partir de 2-nitrobenzilidenos derivados 1,3-dicarbonilos cíclicos e acíclicos **6** (1 mmol) ou de 2-nitrofenilmetilenos derivados de 1,3-dicarbonilos **7** (1 mmol) pelas condições reacionais A ou B abaixo apresentadas.

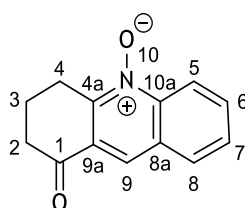
Condições reacionais A: uma mistura de 2-nitrobenzilidenos derivados 1,3-dicarbonilos cíclicos e acíclicos **6** (1mmol) e $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3 mmol; 675 mg) em MeOH e AcOEt (1:1) (mL) foi colocada à temperatura ambiente durante 20 horas. A reação foi seguida por ccf (eluente: AcOEt).

O solvente foi evaporado à secura, ao óleo obtido adicionou-se uma solução de NaOH 5% (5ml) e extraiu-se com AcOEt (8x5ml). Sempre que se formava um precipitado branco na fase aquosa, este era descartado e prosseguia-se com a extração. As fases orgânicas foram reunidas e secas sob Na_2SO_4 . O solvente foi evaporado à secura obtendo-se um sólido amarelo/castanho.

Quando se parte de 2-nitrofenilmetilenos derivados de 1,3-dicarbonilos **7** procede-se a uma recristalização final de modo a obter-se o produto puro.

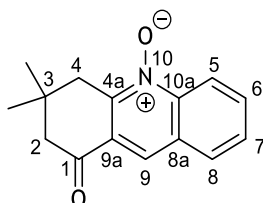
Condições reacionais B: A mistura 2-nitrofenilmetilenos derivados de 1,3-dicarbonilos **7** (1 mmol), $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3 mmol; 675 mg) e HCl (1 mL) em THF (20 mL) foi colocada em refluxo durante 10 minutos. O solvente foi evaporado à secura e adicionou-se AcOEt (2mL). A mistura foi colocada no frigorífico durante 2 dias. O sólido precipitado foi filtrado e lavado com éter de petróleo (3×2 mL).

5.1.6.1. 1-Oxo-1,2,3,4-tetrahydroacridina-10-óxido (**8a**)



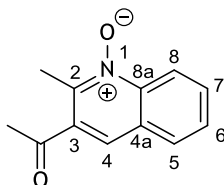
Condições reacionais A: a partir de 2-(2'-nitrobenzilideno)ciclohexan-1,3-diona (**6a**) (1 mmol; 245 mg); η 96%; sólido amarelo; pf 191-192 °C; **Condições reacionais B:** a partir de 2,2'-(2-nitrofenil)metileno)bis(ciclohexan-1,3-diona) (**7c**) (1mmol; 355 mg); η 76%; sólido castanho; pf 191-192 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3057, 3013, 49, 2883, 2008, 1700 (C=O), 1615, 1585, 1563 (N-O), 1500, 1442, 1406, 1374, 1361, 1331, 1317 (N-O), 1272, 1231, 1202, 1179, 1159, 1127, 1093, 971, 922, 901, 844, 783, 753, 720, 642, 627, 606, 565, 550; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 8,57 (dd, 1H, $J = 8,7, 1,1$ Hz, 5-ArCH), 8,47 (s, 1H, 9-ArCH), 8,31 (dd, 1H, $J = 8,2, 1,3$ Hz, 8-ArCH), 7,95 (ddd, 1H, $J = 8,6, 6,9, 1,4$ Hz, 6-ArCH), 7,77 (ddd, 1H, $J = 8,1, 6,9, 1,0$ Hz, 7-ArCH), 3,25 (t, 2H, $J = 6,3$ Hz, 4-CH₂), 2,73 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz, 2-CH₂), 2,17 (p, 2H, $J = 6,5$ Hz, 3-CH₂); RMN de ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 196,03 (1-C=O), 148,74 (4a-ArC), 142,41 (10a-ArC), 132,75 (6-ArCH), 130,89 (8-ArCH), 128,58 (7-ArCH), 127,43 (8a-ArC), 127,36 (9a-ArC), 123,08 (9-ArCH), 118,79 (5-ArCH), 37,45 (2-CH₂), 24,75 (4-CH₂), 19,48 (3-CH₂); SMILES O=C1CCCC2=[N+](O-)C3=C(C=CC=C3)C=C12.

5.1.6.2. 3,3-Dimetil-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydroacridin-10-óxido (8b)



Condições reacionais A: a partir da mistura **6d** e **7a** (0,3 mmol; 87 mg); η 30%; cristais amarelos na forma de agulha; pf 174-175 °C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3057, 2960, 2873, 1693 (C=O), 1615, 1585, 1568 (NO₂), 1498, 1472, 1445, 1393, 1363, 1341, 1319 (NO₂), 1293, 1258, 1233, 1203, 1179, 1114, 1094, 1004, 978, 956, 910, 882, 859, 765, 748, 675, 655, 636, 623, 573, 555; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8,57 (dd, 1H, *J* = 8,8, 1,1 Hz, 5-ArCH), 8,47 (s, 1H, 9-ArCH), 8,31 (dd, 1H, *J* = 8,2, 1,4 Hz, 8-ArCH), 7,94 (ddd, 1H, *J* = 8,6, 6,9, 1,4 Hz, 6-ArCH), 7,77 (ddd, 1H, *J* = 8,1, 6,9, 1,2 Hz, 7-ArCH), 3,18 (s, 2H, 4-CH₂), 2,66 (s, 2H, 2-CH₂), 1,09 (s, 6H, 3-C(CH₃)₂); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 196,35 (1-CO), 147,31 (4a-ArC), 142,78 (10a-ArC), 132,78 (6-ArCH), 131,06 (8-ArCH), 128,81 (7-ArCH), 127,46 (8a-ArC), 126,45 (9a-ArC), 123,17 (9-ArCH), 118,92 (5-ArCH), 50,66 (2-CH₂), 32,27 (4-CH₂), 31,44 (3-C), 28,24 ((CH₃)₂); SMILES O=C1CC(C)(C)CC2=[N+](O-)C3=C(C=CC=C3)C=C12.

5.1.6.3. 3-Acetil-2-metilquinolin -1-óxido (8c)



Condições reacionais A: a partir do 3-(2-nitrobenzilideno)pentan-2,4-diona (**6g**); (0,6 mmol; 141 mg); η 65%; sólido castanho; pf 127-128°C; FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3061, 2963, 2920, 1686 (C=O), 1615, 1568, 1494, 1424 (N-O), 1370, 1357, 1316, 1306, 1260, 1235, 1197, 1175, 1140, 1099, 1017, 939, 917, 798, 766, 746, 648, 623, 610, 581, 543; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8,56 (dd, 1H, *J* = 8,7, 1,0 Hz, 8-ArCH), 8,46 (s, 1H, 4-ArCH), 8,16 (dd, 1H, *J* = 8,2, 1,4 Hz, 5-ArCH), 7,92 (ddd, 1H, *J* = 8,6, 7,0, 1,5 Hz, 7-ArCH), 7,77 (ddd, 1H, *J* = 8,2, 7,0, 1,2 Hz, 6-ArCH), 2,72 (s, 2H, 2-ArCCH₃), 2,64 (s, 2H, 3-ArCCCH₃); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 199,66 (3-ArCCO), 143,74(2-ArC), 141,19 (8a-ArC), 133,41 (7-ArCH), 132,32(5-ArCH), 129,62 (6-ArCH),

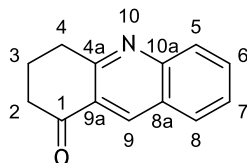
128,71 (4a-ArC), 127,03 (3-ArC), 125,48 (4-ArCH), 119,02 (8-ArCH), 29,76 (3-ArCCCH₃), 15,51 (2-ArCCCH₃); SMILES CC1=[N+]([O-])C2=CC=CC=C2C=C1C(C)=O.

5.1.6.4. Estrutura não determinada

Condição reacional A: a partir de (*E*)-5-(2-nitrobenzilideno)tiazolidino-2,4-diona (**6e**) (1 mmol; 100 mg); óleo castanho; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 12,57 (s, 1H, N-H), 7,89 (s, 1H), 7,34 - 7,24 (m, 2H), 7,3 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz), 6,94 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz).

5.1.7. Quinolina 9

5.1.7.1. 3,4-Dihidroacridin-1(2*H*)-ona (9a)



A uma solução de ciclohexan-1,3-diona (**5a**) (0,89 mmol; 103mg), 2-nitrobenzaldeído (**2**) (0,74 mmol; 113 mg) em ácido acético (4 mL) foi adicionado sob agitação ferro em pó (3,7 mmol; 207 mg). A mistura foi aquecida a 50 °C durante 1 hora e 30 minutos. O ácido foi evaporado sob pressão reduzida e posteriormente adicionou-se EtOAc. A mistura foi filtrada sob celite e o solvente foi evaporado. O crude foi purificado através de uma recristalização em acetato de etilo; η 50%; sólido cinzento; pf 94-95 °C (lit. 105-106 °C)⁸⁴ FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹) 3048, 2951, 2878, 1678 (C=O), 1616, 1592 (N-O), 1558, 1525, 1493, 1463, 1456, 1399, 1375, 1344, 1232, 1205, 1171, 1147, 1128, 999, 937, 908, 792, 766, 699, 643, 612; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8,86 (s, 1H), 8,16 (dd, 1H, *J* = 8,2, 1,3 Hz), 7,99 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz), 7,86 (ddd, 1H, *J* = 8,4, 6,8, 1,4 Hz), 7,61 (t, 1H, *J* = 7,4 Hz), 3,22 (t, 2H, *J* = 6,1 Hz), 2,75 (dd, 2H, *J* = 7,1, 5,7 Hz), 2,16 (p, 2H, *J* = 6,4 Hz); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 197,43, 162,14, 148,90, 136,17, 132,32, 129,98, 128,03, 126,57, 126,37, 126,07, 38,49, 32,70, 21,21; SMILES O=C1CCCC2=NC3=C(C=CC=C3)C=C12.

5.2. Avaliação Biológica

A avaliação da atividade biológica apenas foi realizada para os compostos sintetizados que se encontravam puros por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C .

Nos ensaios de proliferação celular foram utilizadas placas de cultura estéreis de 96 poços (Nunc, Apogent, Denmark) e as linhas celulares foram adquiridas à *American Type Culture Collection* (ATCC), enquanto que os meios de cultura, reagentes e suplementos necessários foram adquiridos à Sigma-Aldrich.

Nos estudos enzimáticos foram utilizadas placas de ELISA de 96 poços. A XO de leite de bovino, assim como todos os outros reagentes, foram adquiridos à Sigma Aldrich.

As leituras das absorvâncias foram efetuadas num espectrofotômetro leitor de microplacas Bio-Rad xMark™.

5.2.1. Determinação *in Vitro* da atividade inibitória da Xantina Oxidase

5.2.1.1. Preparação das soluções dos compostos testados

Todos os compostos testados foram dissolvidos em DMSO, preparando-se uma solução-mãe com uma concentração de 10 mM, usada na preparação de soluções mais diluídas para o *screening* e para a obtenção de curvas concentração-resposta. A solução da xantina (10 mM) foi preparada numa solução aquosa de NaOH 25 mM, tendo sido esta diluída a 0,42 mM em tampão. A solução inicial de XO (4 U / mL) foi diluída em tampão de forma a se obter uma concentração de 0,1 U / mL.

Todas as soluções preparadas foram armazenadas a 4 °C. Antes de cada ensaio, efetuaram-se as diluições das soluções anteriormente preparadas em tampão dihidrogenofosfato de sódio (50 mM) com pH 7,4. No *screening* inicial garantiu-se uma concentração de 30 μM em cada poço, e de 0,01; 0,1; 1; 3,75; 7,5; 15; 30 e 60 μM para obter as curvas concentração-resposta.

Em cada ensaio a concentração final máxima de DMSO foi de 1 %, o que não interferiu com a atividade da enzima (dados não apresentados).

5.2.1.2. Procedimento experimental

A avaliação da atividade inibitória da XO foi determinada espectrofotometricamente, medindo-se a produção de ácido úrico a partir da xantina, de acordo com o método de Figueiredo *et al.*²⁸ Em cada experiência, foram adicionados, em cada poço de uma placa de 96 poços, 50 μL da solução de teste e 50 μL de XO (0,1 U / mL). Seguidamente, a mistura foi pré-incubada a 37 °C

durante 5 minutos. A reação teve início com a adição de 150 µL de xantina 0,42 mM, sendo a mistura resultante incubada a 37°C durante 10 min, com leituras da absorvância a 295 nm de 1 em 1 minuto, após agitação lenta, constante e automática de 20 segundos antes de cada leitura. Como controlo negativo, utilizou-se o tampão dihidrogenofosfato e como controlo positivo o alopurinol. De forma a descontar a absorvância de cada composto, foi realizado um branco da amostra constituído por 50 µL da solução de teste e 200 µL de tampão. Cada estudo corresponde a duas experiências, cada uma realizada em triplicado. A percentagem de inibição da enzima por cada composto em estudo foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = [1 - (\text{Absorvância}_{\text{amostra}} - \text{Absorvância}_{\text{branco}}) / \text{Absorvância}_{\text{controlo negativo}}] \times 100 \quad (1)$$

Inicialmente, realizou-se um *screening* dos compostos a 30 µM de modo a testar a atividade inibitória da enzima. Para os compostos que apresentaram uma diminuição da atividade enzimática superior a 25 % foi calculado o seu valor de IC₅₀.

5.2.2. Estudos celulares

Os efeitos na proliferação celular dos compostos anteriormente sintetizados foram também avaliados e foi usado o 5-FU como controlo positivo. As linhas celulares utilizadas foram as NHDF e MCF-7. O meio foi trocado a cada 2-3 dias.

5.2.2.1. Culturas celulares

As linhas celulares foram incubadas a 37 °C sob atmosfera húmida com 5% de CO₂. A linha celular MCF-7 foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal de bovino (SFB) e 1% de antibiótico/antimicótico (AB - solução com 10,000 unidades/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina e 25 µg/ml de anfotericina-B). Estas células foram utilizadas na experiência na passagem P+38. As células NHDF foram cultivadas em meio de cultura RPMI suplementado com 10% SFB, 2 mM de L-glutamina, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de sódio e 1% de AB. Estas células foram utilizadas nas passagens P+18 e P+19.

5.2.2.2. Preparação das soluções

Os compostos em análise foram dissolvidos em DMSO a uma concentração de 10 mM e foram armazenados a 4 °C. A partir desta solução-mãe, as várias soluções dos compostos foram preparadas por diluição adequada em meio de cultura completo antes de cada experiência. A concentração máxima de DMSO nos ensaios foi 1%, uma concentração que não interfere na viabilidade celular (dados não apresentados).

5.2.2.3. Determinação *In Vitro* da proliferação celular

5.2.2.3.1. Tripsinização e contagem celular

Ambas as células utilizadas aderem à superfície dos frascos de cultura, pelo que foram tripsinizadas quando adquiriram a confluência pretendida. Para tal, utilizou-se tripsina, uma enzima proteolítica que permite a dissociação entre as células e os frascos de cultura. Assim, retirou-se o meio de cultura, procedendo-se à lavagem com uma solução de tampão fosfato salino (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ e 1.8 mM KH₂PO₄ em água destilada, pH 7,4 (PBS)) previamente aquecido a 37 °C. Seguidamente, foram colocados 5 µL de tripsina e incubou-se durante 5 minutos, igualmente a 37 °C. À suspensão celular obtida, adicionou-se meio de cultura completo, de forma a neutralizar a ação da enzima. Seguidamente, a mistura obtida foi centrifugada durante 8 minutos a 1000 rpm e depois o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em meio de cultura. Para proceder à contagem celular, retiraram-se 10 µL da suspensão obtida anteriormente e adicionaram-se 10 µL de uma solução de azul tripano. Esta mistura foi depois colocada numa câmara de *Neubauer*, procedendo-se à contagem das células em cada quadrante. Após se calcular a média dos quatro quadrantes aplicou-se a fórmula de *Neubauer*. Assim, como se pretendia uma concentração inicial de 2×10^4 células/mL, calculou-se o volume de suspensão necessário a diluir no volume total de meio necessário para realização dos ensaios.

5.2.2.3.2. Incubação dos compostos

Após a tripsinização, contagem e adequada diluição das células, 100 µL da suspensão celular no meio com densidade inicial de 2×10^4 células/mL foi semeada em cada poço das placas de cultura de 96 poços, deixando-se aderir por 48h. Após as 48h, o meio foi removido e substituído pelas várias soluções de compostos em estudo, no respetivo meio de cultura, incubando-se por 72h. Como controlo negativo foram utilizadas as células não tratadas.

5.2.2.3.3. Ensaio MTT - viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada quantificando a redução do MTT. Após o período de incubação de 72h o meio foi removido, foram adicionados 100 µL de PBS para lavar as células e, em seguida, 100 µL de solução de MTT (5mg/mL), preparada no meio de cultura adequado isento de soro, foram adicionados a cada poço, seguindo-se um período de incubação de 4h a 37 °C. Em seguida, o meio contendo MTT foi removido e os cristais de formazano foram dissolvidos em DMSO. As absorvâncias foram lidas num espectrofotómetro de microplacas Bio-Rad xMark™ a 570 nm. A extensão da morte celular foi expressa como percentagem de viabilidade celular relativamente às células utilizadas como controlo negativo.

5.2.3. Análise Estatística

Os resultados dos ensaios de viabilidade celular em NHDF são representativos de duas experiências independentes, e nas MCF-7 são representados os resultados da única experiência realizada. No ensaio da atividade inibitória da XO, os resultados são representativos de uma experiência independente. Estes resultados são expressos como valores médios \pm erro padrão da média (SEM). Para determinar a significância estatística ($p < 0,05$) foi aplicado o teste *t*-Student. Os valores de IC_{50} para os ensaios de proliferação celular foram calculados a partir da curva de concentração-resposta por ajuste sigmoide (intervalo de confiança de 95%).

5.3. Estudos *in silico*

5.3.1. Previsão de propriedades farmacocinéticas relevantes e de toxicidade

A previsão de propriedades farmacocinéticas e de toxicidade relevantes foi realizada para os compostos que apresentaram atividades relevantes, quer na inibição da XO, quer nos ensaios de proliferação celular, mediante o uso do software *pkSCM on-line*, em <http://bleoberis.bioc.cam.ac.uk/pkscsm/prediction>.

5.3.2. Docking molecular

O estudo de *docking* molecular foi realizado para os compostos sintetizados que apresentam uma inibição na XO acima de 25%, o alopurinol, o composto para a validação do método e a enzima XOR, no seu sítio ativo.

O desenho das estruturas bidimensionais e a minimização de energias em 3D realizaram-se utilizando o software *ChemOffice* versão 14.0. da CamBridgeSoft.

A estrutura cristalina da XO com o código 1VDV (1.98 Å de resolução) foi obtida através do *PDB database*. A proteína e o ligando foram isolados utilizando o software *Chimera* 1.10.2. Para preparar as moléculas para o *docking*, definir parâmetros e analisar resultados utilizou-se o software *AutoDock Tools* 1.5.6. Todos os cálculos de *docking* foram efetuados usando o software *AutoDock* 4.0. As interações entre o ligando e o sítio ativo da proteína foram visualizadas através do software *Discovery Studio Visualizer* v16.1.

A proteína foi preparada removendo as moléculas de água, adicionando cargas de *Gasteiger* e removendo os hidrogénios não polares. Os parâmetros do ligando foram mantidos inalterados. A validação do método foi realizada com o acoplamento do XO com o Y-700.

O local para o *docking* foi definido recorrendo a uma *grid box* de dimensões de 60 x 60 x 60 Å com um espaçamento de 0,300 Å em torno do centro do ligando co-cristalizado, garantindo-se, assim, que os ligandos estudados ocupam o espaço a eles limitado. Para a execução da *gride*, foi adicionado o nome da biblioteca de parâmetros "AD4_Parameters.dat" (anexo 1). O algoritmo *Lamarckian genetic* foi utilizado como método de pesquisa de *docking* e foram geradas 10 conformações diferentes.

Capítulo 6 - Bibliografía

1. Lombardino, J. G.; Lowe, J. A., The role of the medicinal chemist in drug discovery-then and now. *Nature Reviews Drug Discovery* **2004**, 3 (10), 853-62.
2. Dias, D. A.; Urban, S.; Roessner, U., A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites* **2012**, 2 (2), 303-36.
3. Pina, A. S.; Hussain, A.; Roque, A. C., An historical overview of drug discovery. *Methods in Molecular Biology* **2009**, 572, 3-12.
4. Drews, J., Drug discovery: a historical perspective. *Science (New York, N.Y.)* **2000**, 287 (5460), 1960-4.
5. Hughes, J. P.; Rees, S.; Kalindjian, S. B.; Philpott, K. L., Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology* **2011**, 162 (6), 1239-49.
6. Ou-Yang, S. S.; Lu, J. Y.; Kong, X. Q.; Liang, Z. J.; Luo, C.; Jiang, H., Computational drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica* **2012**, 33 (9), 1131-40.
7. Pires, D. E.; Blundell, T. L.; Ascher, D. B., pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, 58 (9), 4066-72.
8. Suvarna, V., Phase IV of drug development. *Perspectives in Clinical Research* **2010**, 1 (2), 57-60.
9. Baldi, A., Computational approaches for drug design and discovery: An overview. *Systematic Reviews in Pharmacy* **2010**, 1 (1), 99.
10. Sliwoski, G.; Kothiwale, S.; Meiler, J.; Lowe, E. W., Computational methods in drug discovery. *Pharmacological Reviews* **2014**, 66 (1), 334-395.
11. Ou-Yang, S.-s.; Lu, J.-y.; Kong, X.-q.; Liang, Z.-j.; Luo, C.; Jiang, H., Computational drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica* **2012**, 33 (9), 1131.
12. Morris, G. M.; Lim-Wilby, M., Molecular docking. In *Molecular Modeling of Proteins*, Springer: 2008, 365-382.
13. de Ruyck, J.; Brysbaert, G.; Blossey, R.; Lensink, M. F., Molecular docking as a popular tool in drug design, an *in silico* travel. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry* **2016**, 9, 1-11.
14. Dar, A.; Mir, S., Molecular docking: approaches, types, applications and basic challenges. *Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques* **2017**, 8, 2.

15. Matias, M.; Fortuna, A.; Bicker, J.; Silvestre, S.; Falcao, A.; Alves, G., Screening of pharmacokinetic properties of fifty dihydropyrimidin(thi)one derivatives using a combo of in vitro and *in silico* assays. *European Journal Pharmaceutical Sciences* **2017**, *109*, 334-346.
16. Ou-Yang, S. S.; Lu, J. Y.; Kong, X. Q.; Liang, Z. J.; Luo, C.; Jiang, H., Computational drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica* **2012**, *33* (9), 1131-40.
17. Lipinski, C. A., Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **2000**, *44* (1), 235-249.
18. Lipinski, C. A., Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies* **2004**, *1* (4), 337-341.
19. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64*, 4-17.
20. Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D., Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45* (12), 2615-2623.
21. Whitebread, S.; Hamon, J.; Bojanic, D.; Urban, L., Keynote review: in vitro safety pharmacology profiling: an essential tool for successful drug development. *Drug Discovery Today* **2005**, *10* (21), 1421-33.
22. Andrade, E. L.; Bento, A. F.; Cavalli, J.; Oliveira, S. K.; Freitas, C. S.; Marcon, R.; Schwanke, R. C.; Siqueira, J. M.; Calixto, J. B., Non-clinical studies required for new drug development - Part I: early in silico and in vitro studies, new target discovery and validation, proof of principles and robustness of animal studies. *Brazilian Journal of Medicinal Biological Research* **2016**, *49* (11), e5644.
23. Terry, L.; Richard, A.; Andrew, L.; Helene, A.; Tracy, J.; Lisa, M.; Douglas, S.; Yvonne, R., Cell viability assays. *Assay Guidance Manual* **2015**, *29*, 27-31.
24. Seidl, K.; Zinkernagel, A. S., The MTT assay is a rapid and reliable quantitative method to assess staphylococcus aureus induced endothelial cell damage. *Journal of Microbiological Methods* **2013**, *92* (3), 307-309.
25. Smelcerovic, A.; Tomovic, K.; Smelcerovic, Z.; Petronijevic, Z.; Kocic, G.; Tomasic, T.; Jakopin, Z.; Anderluh, M., Xanthine oxidase inhibitors beyond allopurinol and febuxostat; an overview and selection of potential leads based on in silico calculated physico-chemical

- properties, predicted pharmacokinetics and toxicity. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *135*, 491-516.
26. Tamta, H.; Kalra, S.; Mukhopadhyay, A. K., Biochemical characterization of some pyrazolopyrimidine-based inhibitors of xanthine oxidase. *Biochemistry. Biokhimiia* **2006**, *71 Suppl 1*, S49-54.
 27. Kelley, E. E.; Khoo, N. K.; Hundley, N. J.; Malik, U. Z.; Freeman, B. A.; Tarpey, M. M., Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radical Biology & Medicine* **2010**, *48* (4), 493-8.
 28. Figueiredo, J.; Serrano, J. L.; Cavaleiro, E.; Keurulainen, L.; Yli-Kauhaluoma, J.; Moreira, V. M.; Ferreira, S.; Domingues, F. C.; Silvestre, S.; Almeida, P., Trisubstituted barbiturates and thiobarbiturates: synthesis and biological evaluation as xanthine oxidase inhibitors, antioxidants, antibacterial and anti-proliferative agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *143*, 829-842.
 29. Asai, R.; Nishino, T.; Matsumura, T.; Okamoto, K.; Igarashi, K.; Pai, E. F.; Nishino, T., Two mutations convert mammalian xanthine oxidoreductase to highly superoxide-productive xanthine oxidase. *Journal of Biochemistry* **2007**, *141* (4), 525-534.
 30. Berry, C. E.; Hare, J. M., Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *The Journal of Physiology* **2004**, *555* (3), 589-606.
 31. Beedkar, S. D.; Khobragade, C. N.; Chobe, S. S.; Dawane, B. S.; Yemul, O., Novel thiazolo-pyrazolyl derivatives as xanthine oxidase inhibitors and free radical scavengers. *International Journal of Biological Macromolecules* **2012**, *50* (4), 947-956.
 32. Pacher, P.; Nivorozhkin, A.; Szabó, C., Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacological Reviews* **2006**, *58* (1), 87-114.
 33. Bandgar, B. P.; Adsul, L. K.; Chavan, H. V.; Shringare, S. N.; Korbade, B. L.; Jalde, S. S.; Lonikar, S. V.; Nile, S. H.; Shirfule, A. L., Synthesis, biological evaluation, and molecular docking of N-{3-[3-(9-methyl-9H-carbazol-3-yl)-acryloyl]-phenyl}-benzamide/amide derivatives as xanthine oxidase and tyrosinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, *20* (18), 5649-57.
 34. Beedkar, S. D.; Khobragade, C. N.; Chobe, S. S.; Dawane, B. S.; Yemul, O. S., Novel thiazolo-pyrazolyl derivatives as xanthine oxidase inhibitors and free radical scavengers. *International Journal of Biological Macromolecules* **2012**, *50* (4), 947-56.

35. Kumar, R.; Darpan; Sharma, S.; Singh, R., Xanthine oxidase inhibitors: a patent survey. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2011**, 21 (7), 1071-108.
36. Matsumoto, K.; Okamoto, K.; Ashizawa, N.; Nishino, T., FYX-051: a novel and potent hybrid-type inhibitor of xanthine oxidoreductase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2011**, 336 (1), 95-103.
37. Arora, P.; Arora, V.; Lamba, H.; Wadhwa, D., Importance of heterocyclic chemistry: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **2012**, 3 (9), 2947.
38. Kumar, S.; Bawa, S.; Gupta, H., Biological activities of quinoline derivatives. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **2009**, 9 (14), 1648-1654.
39. Jain, S.; Chandra, V.; Jain, P. K.; Pathak, K.; Pathak, D.; Vaidya, A., Comprehensive review on current developments of quinoline-based anticancer agents. *Arabian Journal of Chemistry* **2016**.
40. Rajawinslin, R.; Gawande, S. D.; Kavala, V.; Huang, Y.-H.; Kuo, C.-W.; Kuo, T.-S.; Chen, M.-L.; He, C.-H.; Yao, C.-F., Iron/acetic acid mediated intermolecular tandem C-C and C-N bond formation: an easy access to acridinone and quinoline derivatives. *RSC Advances* **2014**, 4 (71), 37806-37811.
41. Mandewale, M. C.; Patil, U. C.; Shedge, S. V.; Dappadwad, U. R.; Yamgar, R. S., A review on quinoline hydrazone derivatives as a new class of potent antitubercular and anticancer agents. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* **2017**.
42. Marella, A.; Tanwar, O. P.; Saha, R.; Ali, M. R.; Srivastava, S.; Akhter, M.; Shaquiquzzaman, M.; Alam, M. M., Quinoline: A versatile heterocyclic. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2013**, 21 (1), 1-12.
43. Manske, R., The chemistry of quinolines. *Chemical Reviews* **1942**, 30 (1), 113-144.
44. Olsen, R. A.; Borchardt, D.; Mink, L.; Agarwal, A.; Mueller, L. J.; Zaera, F., Effect of protonation on the conformation of cinchonidine. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128 (49), 15594-15595.
45. Igarashi, J.; Kobayashi, Y., Improved synthesis of quinine alkaloids with the Teoc protective group. *Tetrahedron Letters* **2005**, 46 (37), 6381-6384.
46. Cheng, C. C.; Yan, S. J., The Friedländer synthesis of quinolines. *Organic Reactions* **2004**, 28, 37-201.

47. Teimouri, A.; Chermahini, A. N., A mild and highly efficient Friedländer synthesis of quinolines in the presence of heterogeneous solid acid nano-catalyst. *Arabian Journal of Chemistry* **2016**, *9*, S433-S439.
48. Wang, L.-M.; Hu, L.; Chen, H.-J.; Sui, Y.-Y.; Shen, W., One-pot synthesis of quinoline-4-carboxylic acid derivatives in water: Ytterbium perfluorooctanoate catalyzed Doebner reaction. *Journal of Fluorine Chemistry* **2009**, *130* (4), 406-409.
49. Wang, Y.; Peng, C.; Liu, L.; Zhao, J.; Su, L.; Zhu, Q., Sulfuric acid promoted condensation cyclization of 2-(2-(trimethylsilyl) ethynyl) anilines with arylaldehydes in alcoholic solvents: an efficient one-pot synthesis of 4-alkoxy-2-arylquinolines. *Tetrahedron Letters* **2009**, *50* (19), 2261-2265.
50. Hegedüs, A.; Hell, Z.; Vargadi, T.; Potor, A.; Gresits, I., A new, simple synthesis of 1, 2-dihydroquinolines via cyclocondensation using zeolite catalyst. *Catalysis Letters* **2007**, *117* (3-4), 99-101.
51. Zhou, T.; Lin, J.-L.; Chen, Z.-C., A convenient synthesis of quinolines via ionic liquid-catalysed friedlander annulation. *Letters in Organic Chemistry* **2008**, *5* (1), 47-50.
52. Ghassamipour, S.; Sardarian, A., Friedländer synthesis of poly-substituted quinolines in the presence of dodecylphosphonic acid (DPA) as a highly efficient, recyclable and novel catalyst in aqueous media and solvent-free conditions. *Tetrahedron Letters* **2009**, *50* (5), 514-519.
53. Xia, H.; Liu, Y.; Zhao, P.; Gou, S.; Wang, J., Synthesis of 2-alkenylquinoline by reductive olefination of quinoline *N*-oxide under metal-free conditions. *Organic Letters* **2016**, *18* (8), 1796-1799.
54. Familoni, O. B.; Klaas, P. J.; Lobb, K. A.; Pakade, V. E.; Kaye, P. T., The Baylis-Hillman approach to quinoline derivatives. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2006**, *4* (21), 3960-3965.
55. Mfuh, A. M.; Larionov, O. V., Heterocyclic *N*-Oxides - An emerging class of therapeutic agents. *Current Medicinal Chemistry* **2015**, *22* (24), 2819-57.
56. Youssif, S., Recent trends in the chemistry of pyridine *N*-oxides. *Arkivoc* **2001**, *1*, 242-268.
57. Stephens, D. E.; Chavez, G.; Valdes, M.; Dovalina, M.; Arman, H. D.; Larionov, O. V., Synthetic and mechanistic aspects of the regioselective base-mediated reaction of perfluoroalkyl- and perfluoroarylsilanes with heterocyclic *N*-oxides. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2014**, *12* (32), 6190-6199.

58. Larionov, O. V.; Stephens, D.; Mfuh, A. M.; Arman, H. D.; Naumova, A. S.; Chavez, G.; Skenderi, B., Insights into the mechanistic and synthetic aspects of the Mo/P-catalyzed oxidation of *N*-heterocycles. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2014**, *12* (19), 3026-3036.
59. Palani, A.; Shapiro, S.; Josien, H.; Bara, T.; Clader, J. W.; Greenlee, W. J.; Cox, K.; Strizki, J. M.; Baroudy, B. M., Synthesis, SAR, and biological evaluation of oximino-piperidino-piperidine amides. 1. Orally bioavailable CCR5 receptor antagonists with potent anti-HIV activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45* (14), 3143-3160.
60. Wang, Y.; Zhang, L., Recent developments in the chemistry of heteroaromatic *N*-oxides. *Synthesis* **2015**, *47* (03), 289-305.
61. Kesten, S. J.; Degnan, M. J.; Hung, J.; McNamara, D. J.; Ortwine, D. F.; Uhlendorf, S. E.; Werbel, L. M., Antimalarial drugs. 64. Synthesis and antimalarial properties of 1-imino derivatives of 7-chloro-3-substituted-3, 4-dihydro-1, 9 (2H, 10H)-acridinediones and related structures. *Journal of Medicinal Chemistry* **1992**, *35* (19), 3429-3447.
62. Jana, N. K.; Verkade, J. G., Phase-vanishing methodology for efficient bromination, alkylation, epoxidation, and oxidation reactions of organic substrates. *Organic Letters* **2003**, *5* (21), 3787-3790.
63. Copéret, C.; Adolfsson, H.; Chiang, J. P.; Yudin, A. K.; Sharpless, K. B., A simple and efficient method for the preparation of pyridine-*N*-oxides II. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39* (8), 761-764.
64. Vardanyan, R.; Hruby, V., *Synthesis of best-seller drugs*. Academic Press: 2016.
65. Badertscher, M.; Bühlmann, P.; Pretsch, E., *Structure determination of organic compounds*. Springer Berlin Heidelberg: 2009.
66. Serrano, J. L.; Cavaleiro, E.; Barroso, S.; Romao, M. J.; Silvestre, S.; Almeida, P., A synthetic route to novel 3-substituted-2, 1-benzisoxazoles from 5-(2-nitrobenzylidene)(thio) barbiturates. *Comptes Rendus Chimie* **2017**, *20* (11-12), 990-995.
67. Li, Z.-N.; Chen, X.-L.; Fu, Y.-J.; Wang, W.; Luo, M., A facile synthesis of trisubstituted alkenes from β -diketones and aldehydes with AlCl_3 as catalyst. *Research on Chemical Intermediates* **2012**, *38* (1), 25-35.
68. Yu, J.-J.; Wang, L.-M.; Liu, J.-Q.; Guo, F.-L.; Liu, Y.; Jiao, N., Synthesis of tetraketones in water and under catalyst-free conditions. *Green Chemistry* **2010**, *12* (2), 216-219.
69. Sandhu, H. S.; Sapra, S.; Gupta, M.; Nepali, K.; Gautam, R.; Yadav, S.; Kumar, R.; Jachak, S. M.; Chugh, M.; Gupta, M. K.; Suri, O. P.; Dhar, K. L., Synthesis and biological evaluation

- of arylidene analogues of meldrum's acid as a new class of antimalarial and antioxidant agents. *Bioorganic Medicinal Chemistry* **2010**, *18* (15), 5626-33.
70. Yang, P. H.; Zhang, Q. Z.; Sun, W., Clean synthesis of 2-arylideneindan-1,3-diones in water. *Research on Chemical Intermediates* **2012**, *38* (3), 1063-1068.
 71. Martínez, R.; Espinosa-Pérez, G.; Brito-Arias, M., Synthesis of 3, 4-dihydro-3, 3-dimethyl-1 (2*H*)-acridinone. *Journal of Chemical Crystallography* **1995**, *25* (4), 201-203.
 72. Zaytsev, S. V.; Villemson, E. V.; Ivanov, K. L.; Budynina, E. M.; Melnikov, M. Y., Synthesis of functionalized quinolines from 4-(*o*-nitroaryl)-substituted 3-acyl-4, 5-dihydrofurans: reductive cyclization and C= C bond cleavage. *European Journal of Organic Chemistry* **2017**, *2017* (19), 2814-2823.
 73. Tânăsescu, I.; Dénes, I., Thiazolochinoline, I. Im thiazolkern substituierte thiazolo [4.5-*b*] chinoline. *Chemische Berichte* **1957**, *90* (4), 495-499.
 74. Tryambake, P., Microwave assisted urea-acetic acid catalyzed Knoevenagel condensation of ethyl cyanoacetate and 1,3-thiazolidine-2,4-dione with aromatic aldehydes under solvent free condition. *Asian Journal of Chemistry*, **2017**, *29*, 2401-2405.
 75. Casadesus, M.; Coogan, M. P.; Ooi, L. L., Synthesis of 5-alkylidene-1,3-dioxane-4,6-diones, an easily accessible family of axially chiral alkenes: preparation in non-racemic form and platinum binding studies. *Organic Biomolecular Chemistry* **2006**, *4* (20), 3822-30.
 76. Hu, Z.; Yuan, H.; Men, Y.; Liu, Q.; Zhang, J.; Xu, X., Cross-cycloaddition of two different isocyanides: chemoselective heterodimerization and [3+2]-cyclization of 1, 4-diazabutatriene. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55* (25), 7077-7080.
 77. Nakhaei, A.; Morsali, A.; Davoodnia, A., An efficient green approach to aldol and cross-aldol condensations of ketones with aromatic aldehydes catalyzed by nanometasilica disulfuric acid in water. *Russian Journal of General Chemistry* **2017**, *87* (5), 1073-1078.
 78. Prajapati, D.; Sandhu, J. S., Bismuth (III) chloride as a new catalyst for Knoevenagel condensation in the absence of solvent. *Chemistry Letters* **1992**, *21* (10), 1945-1946.
 79. Miri, R.; Motamedi, R.; Rezaei, M. R.; Firuzi, O.; Javidnia, A.; Shafiee, A., Design, synthesis and evaluation of cytotoxicity of novel chromeno [4, 3-*b*] quinoline derivatives. *Archiv der Pharmazie* **2011**, *344* (2), 111-118.
 80. Motamedi, R.; Bardajee, G. R.; Shakeri, S., Facile one-pot synthesis of chromeno [4, 3-*b*] quinoline derivatives catalyzed by Cu (II)-Schiff base/SBA-15. *Heterocyclic Communications* **2014**, *20* (3), 181-184.

81. Murugan, P.; Hwang, K. C.; Thirumalai, D.; Ramakrishnan, V. T., Facile and simple route to the synthesis of condensed acridine systems. *Synthetic Communications* **2005**, *35* (13), 1781-1788.
82. Brito-Arias, M.; Ramirez, G.; Rivas, R. E.; Molins, E.; Maniukiewicz, W., 3, 3, 6, 6-Tetramethyl-9-(2-nitrophenyl)-3, 4, 5, 6, 9, 10-hexahydroacridine-1, 8 (2*H*, 7*H*)-dione. *Acta Crystallographica Section C* **1996**, *52* (11), 2811-2814.
83. Chauhan, J.; Fletcher, S., One-pot synthesis of 2, 1-benzisoxazoles (anthranils) by a stannous chloride-mediated tandem reduction-heterocyclization of 2-nitroacylbenzenes under neutral conditions. *Tetrahedron Letters* **2012**, *53* (37), 4951-4954.
84. Yu, Z.-H.; Zheng, H.-F.; Yuan, W.; Tang, Z.-L.; Zhang, A.-D.; Shi, D.-Q., An unexpected one-pot synthesis of multi-substituted quinolines via a cascade reaction of Michael/Staudinger/aza-Wittig/aromatization of ortho-azido-*o*-nitro-styrenes with various carbonyl compounds. *Tetrahedron* **2013**, *69* (38), 8137-8141.
85. Ochoa-Chavez, A.; Pieczyńska, A.; Borzyszkowska, A. F.; Espinoza-Montero, P.; Siedlecka, E. M., Electrochemical degradation of 5-FU using a flow reactor with BDD electrode: comparison of two electrochemical systems. *Chemosphere* **2018**, *201*, 816-825.
86. Chandrika, B.-R.; Kulkarni-Almeida, A.; Katkar, K. V.; Khanna, S.; Ghosh, U.; Keche, A.; Shah, P.; Srivastava, A.; Korde, V.; Nemmani, K. V., Identification of novel isocytosine derivatives as xanthine oxidase inhibitors from a set of virtual screening hits. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, *20* (9), 2930-2939.
87. Ali, H. I.; Fujita, T.; Akaho, E.; Nagamatsu, T., A comparative study of AutoDock and PMF scoring performances, and SAR of 2-substituted pyrazolotriazolopyrimidines and 4-substituted pyrazolopyrimidines as potent xanthine oxidase inhibitors. *Journal of Computer - Aided Molecular Design* **2010**, *24* (1), 57-75.
88. Kikuchi, H.; Fujisaki, H.; Furuta, T.; Okamoto, K.; Leimkuhler, S.; Nishino, T., Different inhibitory potency of febuxostat towards mammalian and bacterial xanthine oxidoreductases: insight from molecular dynamics. *Scientific Reports* **2012**, *2*, 331.
89. Lipinski, C. A., Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies* **2004**, *1* (4), 337-41.
90. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *46* (1-3), 3-26.

Capítulo 7 - Publicações

Comunicações, na forma de poster, no âmbito desta dissertação

Reis M., Serrano J. L., Silvestre S., Almeida P., A new synthetic route to prepare quinoline-*N*-oxides, abstracts book do IV Encontro Nacional dos Estudantes de Química, Universidade da Beira Interior, 2018 (anexo 2).

Reis M., Serrano J. L., Silvestre S., Almeida P., An alternative and direct cyclization route to new quinoline-*N*-oxides, abstracts book do XIII Annual CICS-UBI Symposium, Universidade da Beira Interior, 2018 (anexo 3).

Artigo Científico em revistas internacionais peer-reviewed referenciadas no Journal Citation Reports (JCR) da ISI Web of Knowledge e/ou SciVerse Scopus

Serrano J. L., Soeiro P. F., Reis M. A., Silvestre S., Boto R. E. F., Almeida P., The synthesis and process optimization of symmetric and asymmetric 3-substituted-2,1-benzisoxazoles from 5-(2-nitrobenzylidene)(thio)barbiturates, *Tetrahedron Letters* **2018** (submetido) (anexo 4).

Capítulo 8 - Anexos

Anexo 1 - Ficheiro “AD4_Parameters.dat”

Cedido pelo Dr. Renjith Raveendran Pillai do *TKM College of Arts and Science*, India

```

# $Id: AD4_parameters.dat,v 1.4 2005/10/31 18:36:45 rhuey Exp $

# AutoDock Parameters - Version 1.0

#
# AutoDock 4 coefficient with respect to original (AD2) parameters
#

FE_coeff_vdW 0.1560
FE_coeff_hbond 0.0974
FE_coeff_estat 0.1465
FE_coeff_desolv 0.1159
FE_coeff_tors 0.2744

# - Unweighted vdW and Unweighted hbond Well Depths
#
# - To obtain the Rij value for non H-bonding atoms, calculate the
# arithmetic mean of the Rii values for the two atom types.
#
# - To obtain the epsij value for non H-bonding atoms, calculate the
# geometric mean of the epsii values for the two atom types.
#
# - Note that the Rij_hb value is non-zero for heteroatoms only, and
# zero for H atoms;
# to obtain the Rij_hb for an H-bond, look up for the heteroatom only;
# do not combine Rij_hb values between heteroatoms and hydrogens;
# Similarly, for epsij_hb values.
#
# For example, the Rij_hb for OA-HD H-bonds will be 1.9 Angstrom,
# and epsij_hb will be 5.0 kcal/mol.
#
# Rii Rij_hb rec_index
# Atom epsii solpar epsij_hb map_index
# Type vol hbond bond_index
# -- -----
atom_par C 4.00 0.150 33.5103 -0.00143 0.0 0.0 0 -1 -1 0 # Non H-bonding
atom_par A 4.00 0.150 33.5103 -0.00052 0.0 0.0 0 -1 -1 0 # Non H-bonding
atom_par N 3.50 0.160 22.4493 -0.00162 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par NA 3.50 0.160 22.4493 -0.00162 1.9 5.0 4 -1 -1 1 # Acceptor 1 H-bond
atom_par NS 3.50 0.160 22.4493 -0.00162 1.9 5.0 3 -1 -1 1 # Acceptor S Spherical
atom_par OA 3.20 0.200 17.1573 -0.00251 1.9 5.0 3 -1 -1 2 # Acceptor 2 H-bonds
atom_par OS 3.20 0.200 17.1573 -0.00251 1.9 5.0 3 -1 -1 2 # Acceptor S Spherical
atom_par SA 4.00 0.200 33.5103 -0.00214 2.5 1.0 5 -1 -1 6 # Acceptor 2 H-bonds
atom_par S 4.00 0.200 33.5103 -0.00214 0.0 0.0 0 -1 -1 6 # Non H-bonding
atom_par H 2.00 0.020 0.0000 0.00051 0.0 0.0 0 -1 -1 3 # Non H-bonding
atom_par HD 2.00 0.020 0.0000 0.00051 0.0 0.0 2 -1 -1 3 # Donor 1 H-bond
atom_par HS 2.00 0.020 0.0000 0.00051 0.0 0.0 1 -1 -1 3 # Donor S Spherical
atom_par P 4.20 0.200 38.7924 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 5 # Non H-bonding
atom_par Br 4.33 0.389 42.5661 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
atom_par BR 4.33 0.389 42.5661 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
atom_par Ca 1.98 0.550 2.7700 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
atom_par CA 1.98 0.550 2.7700 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
atom_par Cl 4.09 0.276 35.8235 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-binding
atom_par CL 4.09 0.276 35.8235 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-binding
atom_par F 3.09 0.080 15.4480 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-binding
atom_par Fe 1.30 0.010 1.8400 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
atom_par FE 1.30 0.010 1.8400 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
atom_par I 4.72 0.550 55.0585 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-binding
atom_par Mg 1.30 0.875 1.5600 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
atom_par MG 1.30 0.875 1.5600 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
atom_par Mn 1.30 0.875 2.1400 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
atom_par MN 1.30 0.875 2.1400 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding

```

atom_par Zn 1.48 0.550 1.7000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
atom_par ZN 1.48 0.550 1.7000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 4 # Non H-bonding
atom_par He 2.36 0.056 15.240 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 0 # Non H-bonding
atom_par Li 2.45 0.025 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Be 2.76 0.085 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par B 4.08 0.180 12.052 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 0 # Non H-bonding
atom_par Ne 3.24 0.042 15.440 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 0 # Non H-bonding
atom_par Na 3.98 0.030 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Al 4.49 0.505 11.278 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Si 4.30 0.402 12.175 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par K 3.81 0.035 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Sc 3.30 0.019 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Ti 3.18 0.017 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par V 3.14 0.016 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Co 2.87 0.014 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Ni 2.83 0.015 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Cu 3.50 0.005 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Ga 4.38 0.415 11.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Ge 4.28 0.379 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par As 4.23 0.309 13.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Se 4.21 0.291 14.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Kr 4.14 0.220 16.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Rb 4.11 0.040 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 2 # Non H-bonding
atom_par Sr 3.64 0.235 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 2 # Non H-bonding
atom_par Y 3.35 0.072 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Zr 3.12 0.069 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Nb 3.17 0.059 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Mo 3.05 0.056 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Tc 3.00 0.048 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Ru 2.96 0.056 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Rh 2.93 0.053 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Pd 1.34 0.048 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Ag 3.15 0.036 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Cd 2.85 0.228 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par In 4.46 0.599 11.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Sn 4.39 0.567 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Sb 4.42 0.449 13.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Te 4.47 0.398 14.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Xe 4.40 0.332 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Cs 4.52 0.045 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 2 # Non H-bonding
atom_par Ba 3.70 0.364 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 2 # Non H-bonding
atom_par La 3.52 0.017 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Ce 3.56 0.013 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Pr 3.61 0.010 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Nd 3.58 0.010 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Pm 3.55 0.009 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Sm 3.52 0.008 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Eu 3.49 0.008 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Gd 3.37 0.009 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Tb 3.45 0.007 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Dy 3.43 0.007 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Ho 3.41 0.007 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Er 3.39 0.007 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Tm 3.37 0.006 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Yb 3.36 0.228 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Lu 3.64 0.041 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Hf 3.41 0.072 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Ta 3.71 0.081 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par W 3.07 0.067 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Re 2.95 0.066 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Os 3.12 0.120 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Ir 2.84 0.073 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding

atom_par Pt 2.75 0.080 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Au 3.29 0.039 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Hg 2.71 0.385 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Tl 4.35 0.680 11.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Pb 4.30 0.663 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Bi 4.37 0.518 13.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Po 4.71 0.325 14.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par At 4.75 0.284 15.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Rn 4.77 0.248 16.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Fr 4.90 0.050 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 2 # Non H-bonding
atom_par Ra 3.68 0.404 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 2 # Non H-bonding
atom_par Ac 3.48 0.033 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Th 3.40 0.026 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Pa 3.42 0.022 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par U 3.40 0.022 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Np 3.42 0.019 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Pu 3.42 0.016 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Am 3.38 0.014 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Cm 3.33 0.014 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Bk 3.34 0.013 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Cf 3.31 0.013 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par E 3.30 0.012 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding
atom_par Fm 3.29 0.012 12.000 -0.00110 0.0 0.0 0 -1 -1 1 # Non H-bonding

Anexo 2 - Comunicação na forma de poster no âmbito desta dissertação

A new synthetic route to prepare quinoline-*N*-oxides

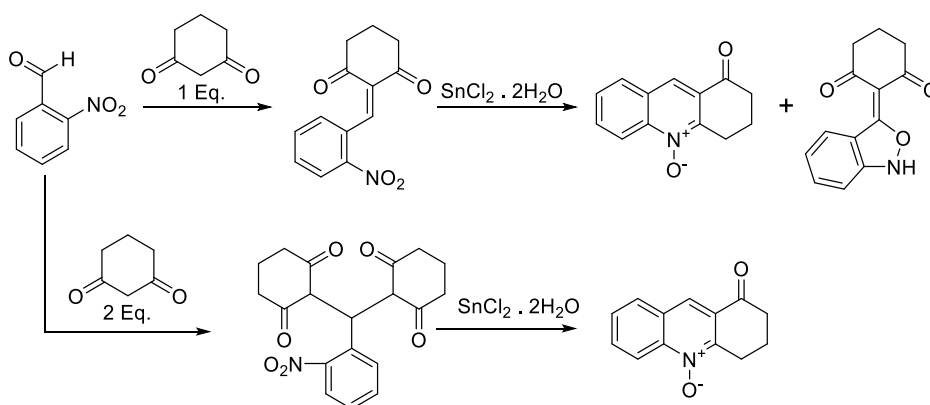
Reis M.¹, Serrano J. L.¹, Silvestre S.^{1,2}, Almeida P.¹

¹ CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal.

² CNC - Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Rua Larga, 3004-517 Coimbra, Portugal.

Since ever, the chemistry of heterocycles had shown great interest to the medicinal chemistry field. As representative examples, benzisoxazoles and quinolones-*N*-oxides have been emerged, being associated to high anticancer, antibacterial, anti-HIV, neuroprotective and anticonvulsant potential [1,2]. Therefore, there is a great interest to develop new compounds of these heterocyclic families in order to obtain new molecules with medicinal application.

Recently, and looking for new bioactive (thio)barbiturates [2], our research group described a new method to obtain 3-substituted-2,1-benzisoxazoles from 5-(2-nitrobenzylidene)(thio)barbiturates [3]. In the course of our research and looking for new related 3-substituted-2,1-benzisoxazoles, the unexpected formation of quinoline-*N*-oxides was observed which was further explored, partially optimized and herein presented as a new route for this class of heterocycles. Interestingly, these *N*-oxides can be obtained by two different routes as depicted above. In the first one, the Knoevenagel condensation followed by a reductive heterocyclization afforded a mixture of a benzisoxazole as previously described [2] and a quinoline-*N*-oxide, which can be isolated by recrystallization. In the second one, the resultant product of the addition of two equivalents of cyclohexa-1,3-dione solely afforded the *N*-oxide in better yields. In both routes, the *N*-oxide formation can be explained by a mechanism involving the nucleophilic attack of the transient hydroxylamine to one of the carbonyl groups, followed by elimination water and also cyclohexane-1,3-dione in the second route.



Acknowledgments:

This work is supported by FEDER funds through the POCI - COMPETE 2020 - Operational Programme Competitiveness and Internationalisation in Axis I - Strengthening research, technological development and innovation (Project POCI-01-0145-FEDER-007491) and National Funds by FCT - Foundation for Science and Technology (Project UID/Multi /00709/2013). J. L. Serrano acknowledges a fellowship from Santander-Totta/UBI (BID/ICI-UID FC/Santander Universidades-UBI/2017).

References:

1. A. M. Mfuh, O. V. Larionov, *Current Medicinal Chemistry*, 2015, 22(24): 2819-2857.
2. J. Figueiredo, J.L. Serrano, E. Cavalheiro, L. Keurulainen, J. Yli-Kauhaluoma, V.M. Moreira, S. Ferreira, F.C. Domingues, S. Silvestre, P. Almeida, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 143, 829-842.
3. J.L. Serrano, E. Cavalheiro, S. Barroso, M.J. Romão, S. Silvestre, P. Almeida, *Comptes Rendus Chimie*, 2017, 20, 990-995.

Anexo 3 - Comunicação na forma de poster no âmbito desta dissertação

An alternative and direct cyclization route to new quinoline-*N*-oxides

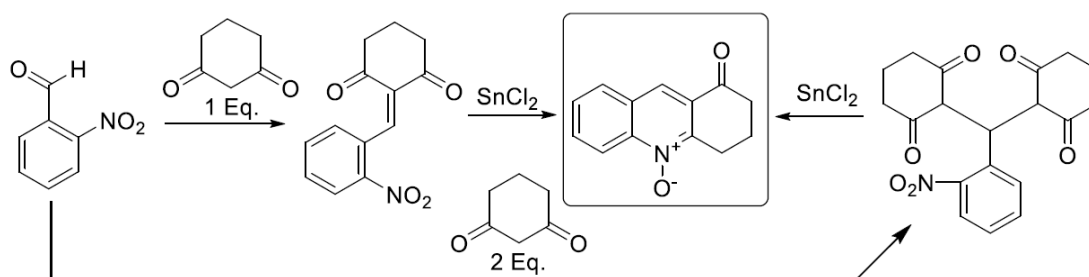
Reis M.^{1,2}, Serrano J. L.^{1,2}, Silvestre S.^{2,3}, Almeida P.^{1,2}

¹ Chemistry Department, Faculty of Sciences, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

² CICS-UBI, Faculty of Health Science, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

³ CNC, University of Coimbra, Coimbra, Portugal.

Since ever, the chemistry of heterocycles had shown great interest to the medicinal chemistry field. Recently, and looking for new bioactive (thio)barbiturates [1], our research group described a new method to obtain 3-substituted-2,1-benzisoxazoles from 5-(2-nitrobenzylidene) (thio)barbiturates [2]. In the course of our research and looking for new related 3-substituted-2,1- benzisoxazoles, the unexpected formation of quinoline-*N*-oxides was observed which was herein presented as a new route for this class of heterocycles. Interestingly, these *N*-oxides were obtained by two different routes, both first involving a Knoevenagel condensation of cyclohexane-1,3-dione (one or two equivalents) with 2-nitrobenzaldehyde, followed by a determinant heterocyclization path after a nitro partial reduction, in alternative to the quinoline oxidation conventional method [3]. In both routes, the *N*-oxide formation can be explained by a mechanism involving the nucleophilic attack of the transient hydroxylamine to one of the carbonyl groups, followed by elimination of water or cyclohexane-1,3-dione in the second route.



Keywords: *N*-oxides, arylidenes, heterocyclization.

Acknowledgments:

This work is supported by FEDER funds through the POCI - COMPETE 2020 - Operational Programme Competitiveness and Internationalisation in Axis I - Strengthening research, technological development and innovation (Project POCI-01-0145-FEDER-007491) and National Funds by FCT - Foundation for Science and Technology (Project UID/Multi /00709/2013). J. L. Serrano acknowledges a fellowship from Santander-Totta/UBI (BID/ICI-UID FC/Santander Universidades-UBI/2017).

References:

1. J. Figueiredo, J.L. Serrano, E. Cavaleiro, L. Keurulainen, J. Yli-Kauhaluoma, V.M. Moreira, S. Ferreira, F.C. Domingues, S. Silvestre, P. Almeida, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 143, 829-842.
2. J.L. Serrano, E. Cavaleiro, S. Barroso, M.J. Romão, S. Silvestre, P. Almeida, *Comptes Rendus Chimie*, 2017, 20, 990-995. 3. A. Plodek, F. Bracher, *Tetrahedron Letters*. 2015, 6, 1445-1447

**Anexo 4 - Artigo Científico em revistas internacionais peer-reviewed
referenciadas no Journal Citation Reports (JCR) da ISI Web of Knowledge
e/ou SciVerse Scopus**



The synthesis and process optimization of symmetric and asymmetric 3-substituted 2,1-benzisoxazoles from 5-(2-nitrobenzylidene)(thio)barbiturates

João L. Serrano^{a, b, ‡}, Pedro F. Soeiro^{a, b, ‡}, Melani A. Reis^{a, b}, Samuel Silvestre^{a, c}, Renato E. F. Boto^{a, b} and Paulo Almeida^{a, b *}

^a CICS-UBI - Health Sciences Research Center, University of Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6201-506 Covilhã, Portugal

^b Department of Chemistry, University of Beira Interior, Rua Marquês D'Ávila e Bolama, 6201-001 Covilhã, Portugal

^c CNC - Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Rua Larga, 3004-517 Coimbra, Portugal

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article history:

Received

Received in revised form

Accepted

Available online

Keywords:

2,1-Benzisoxazoles

Anthranils

Barbituric Acid Derivatives

Process Optimization

Benzisoxazoles represent an important pharmacophore in medicinal chemistry. Recently, an unexpected formation of symmetric 3-substituted 2,1-benzisoxazoles from the reduction of 5-(2-nitrobenzylidene)barbiturates have been described by a reductive intramolecular heterocyclisation involving a nitroso intermediary. As part of our efforts to improve the previous reactional conditions, herein is reported the optimization study of the synthesis of 3-substituted 2,1-benzisoxazoles, where the nature of the reducing agent and additives, time and solvents were explored. In addition, using the optimized conditions several 2,1-benzisoxazoles were prepared in 40-87 % yield. From this set, six compounds have never been described, where the asymmetric nature of the (thio)barbituric acid moiety was for the first time explored. For this, the total synthesis starting from the respective urea or thiourea was successfully performed, where some thiobarbiturates and benzylidenebarbiturate and thiobarbiturate precursors are for the first time described. All the novel compounds showed spectral data, including HRMS, fully consistent with the assigned structures.

2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +351 275329174; fax: +351 275319056; e-mail: paulo.almeida@ubi.pt

‡ These authors contributed equally to this work

1. Introduction

Heterocycles are known to possess a very broad biological activity spectrum and therefore have been found to be a structural key in drugs for varied diseases [1]. As a relevant example, barbituric and thiobarbituric acid derivatives have become progressively attractive to medicinal chemists due to their wide range of biological activities, in addition to their most important and classical use as sedative hypnotics. In fact, functionalized barbiturates and thiobarbiturates have been described as xanthine oxidase inhibitors, antioxidants, antibacterial agents and as anti-proliferative compounds. Classically, these compounds are prepared from the condensation of ureas or thioureas with malonate derivatives [2].

Benzisoxazoles constitute another important pharmacophore in medicinal chemistry. Their wide spectrum of pharmacological activities justifies the presence of this structure in different biologically active compounds in many therapeutic areas [3]. As representative examples, these heterocyclic compounds are present in clinically used antipsychotics (e.g. risperidone, figure 1) and anticonvulsants (e.g. zonisamide, figure 1) [3a]. Benzisoxazoles can be divided into 1,2-benzisoxazoles (indoxazene) and 2,1-benzisoxazoles (anthranils). The first one has been mainly studied from a pharmacological perspective by itself, while the latter is well-known in the preparation of some another biologically active compounds. In fact, 2,1-benzisoxazoles can be used in the preparation of quinazolines and benzodiazepines comprising aminoarylketone intermediates or in the direct preparation of quinolines and acridines [4].

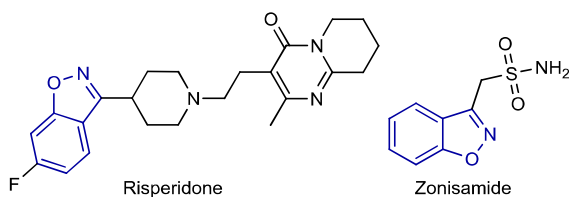
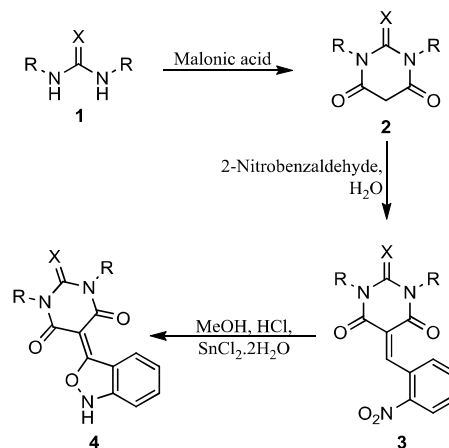


Figure 1 – Example of benzisoxazoles used in the clinic.

After the first anthranil described synthesis by Friedlander and Henriques in 1882 [5], several other methods to prepare this nucleus have been described [4, 6]. Recently, aiming to develop new bioactive barbiturates [2d], we reported the unexpected formation of symmetric 3-substituted 2,1-benzisoxazoles **4** from the reduction of 5-(2-nitrobenzylidene)barbiturates **3** (last step, scheme 1). 2,1-Benzisoxazoles **4** were obtained by a reductive intramolecular heterocyclisation with tin(II) chloride dihydrate in methanol and hydrochloric acid, from moderate to good yields [4a].

As part of our efforts to optimize the previous reactional conditions, herein is reported the optimization study of the process to prepare the 3-substituted 2,1-benzisoxazoles **4**. For this, the nature of the reducing agent and additives, temperature, reaction time and solvents were explored. In addition, ten 2,1-benzisoxazoles were prepared using the herein described optimized conditions in 40-87 % yield. From this set of ten, six were not previously described, and the asymmetric nature of the (thio)barbituric acid moiety was for the first time explored. For this, the total synthesis starting from the respective symmetric or asymmetric urea or thiourea is also described, where five thiobarbiturates and six benzylidene barbiturate and thiobarbiturate precursors are, to the best of our knowledge, for the first time described.

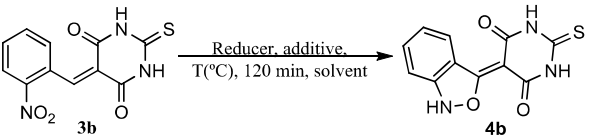


Scheme 1. Preparation of symmetric 3-substituted 2,1-benzisoxazole (thio)barbiturate derivatives **4** [4a]. X = O, S; R = H, CH₃, C₆H₅.

2. Results and discussion

Initially, we aimed to optimize the reaction conditions previously established by our group to obtain 3-substituted 2,1-benzisoxazoles from 5-(2-nitrobenzylidene)(thio)barbiturates [4a]. For this, 2,1-benzisoxazole **4b** (table 1) was used as a model and several variables were explored, namely the nature of the reducing agent, additives, temperature, reaction time and solvents. As expected all of these variables affected the yield of **4b** preparation.

Table 1. Reducer and additive optimization screening on the formation of 3-substituted 2,1-benzisoxazole **4b**.



Entry	Reducer	Additive	T (°C)	Solvent	Yield (%) ^a
1	N ₂ H ₄ ·H ₂ O [7a]	Raney Nickel	0	EtOH/DCM	np ^b
2	KBH ₄ [7b]	BiCl ₃	rt ^c	EtOH/H ₂ O	np ^b
3	Zn [7c]	NH ₄ Cl/H ₂ O	70	MeOH	np ^b
4	Zn [7d]	HCl	Reflux	MeOH	traces
5	Na ₂ S·9H ₂ O [7e]	-	80	Dioxane/H ₂ O	35
6	Sn	HCl	Reflux	MeOH	39
7	SnCl ₂	HCl	Reflux	MeOH	70
8	SnCl ₂ ·2H ₂ O [4a]	HCl	Reflux	MeOH	82
9	SnCl ₂ ·2H ₂ O	AcOH	Reflux	MeOH	62
10	SnCl ₂ ·2H ₂ O	NaHCO ₃ /H ₂ O	Reflux	MeOH	np ^b
11	SnCl ₂ ·2H ₂ O	NaOH/H ₂ O	Reflux	MeOH	np ^b

^a Isolated yields with the pure product; ^b np: no product detected, by NMR analysis after total solvent evaporation; ^c rt: room temperature.

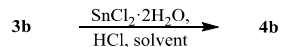
From the selected nitro reducer agents with different strengths [7], tin(II) chloride dihydrate (entry 8, table 1) proved to be the most effective, even when compared to its dehydrated equivalent (entry 7, table 1). A rough analysis of the results involving the variation of the metallic reducer (entries 1-8, table 1) suggests that the yield seems to decrease with the strength of the reductant (more negative electric potential). This result can be understood, regarding the postulated nitroso intermediate involved in this heterocyclisation [4a] whose formation is favored by weaker nitro reducers and therefore their use is expectable to increase the yield of the final benzisoxazoles. The use of hydrazine hydrate and Raney nickel (entry 1, table 1) [7a], potassium borohydride and bismuth trichloride (entry 2, table 1) [7b] or zinc in ammonium chloride (entry 3, table 1) [7c] has been described for the selective reduction of nitroarenes to their hydroxylamine derivatives. However, in our hands, the use of these reducers did not promote the formation of the desired product **4b**, even after 120 minutes of reaction. Once again, this result points to a nitroso rather than a hydroxylamine as the most probable key intermediate in this reaction. On the other hand, the formation of the 2,1-benzisoxazole **4b** appears to occur exclusively in acidic medium (entries 8-9 vs entries 10-11, table 1). Within the two acids explored, hydrochloric acid proved to be most effective than acetic acid. The alternative use of a basic medium (NaHCO₃ or NaOH), which can decrease the velocity of nitro to amine reduction, revealed to not well succeed after 120 minutes of

reaction (entry 10-11, table 1). Thus, the combination of tin(II) chloride dihydrate and hydrochloric acid previously described [4a] showed to be the most effective reductant and additive, respectively, in this reductive heterocyclization.

Subsequently, the temperature, reaction time and solvent effects on 5-(2-nitrobenzylidene)(thio)barbiturate **3b** reduction to afford 2,1-benzisoxazole **4b** using the best reductive conditions [4a] herein supported were analyzed (table 2). Generally, the nature of the solvents and the temperature influenced the yield of **4b** (table 2). In fact, by using methanol as solvent, as previously described [4a], it was observed that the yield increased as the temperature increase until refluxing conditions (entries 1-3, table 2). Interestingly, methanol, ethanol or tetrahydrofuran (THF) at reflux temperatures leads to the highest similar yields, ranging from 80 to 85 % (entries 3, 4 and 8, table 2). However, the use of THF instead of methanol allows shortening the reaction time from 120 to 15 minutes and any advantage was observed when extending the time longer than 15 minutes (entries 8-13, table 2). Thus, using THF at reflux temperature has shown to be the best reaction condition to afford **4b**. In fact, this compound could be obtained in the highest yield (85 %) after 15 min (entry 11, table 2). In addition, the use of this solvent simplifies the isolation procedure since at room temperature the starting material **3b** and the reducer tin(II) chloride dihydrate are soluble, unlike the product **4b**. This allows an easy and direct isolation by filtration of the intended 3-substituted 2,1-benzisoxazole **4b**.

Finally, the effect of the number of equivalents of tin(II) chloride dihydrate and hydrochloric acid on 5-(2-nitrobenzylidene)(thio)barbiturate **3b** reduction to produce 3-substituted 2,1-benzisoxazole **4b** was investigated (table 3) using the best conditions already established. Remarkably, the yield of benzisoxazole **4b** varied to a different extent depending on the ratio of tin(II) chloride dihydrate and hydrochloric acid. In the range between 0.5 to 5.0 equivalents of tin(II) chloride dihydrate in the presence of 15.0 equivalents of HCl (entries 1-5, table 3), the use of 1.0 or 2.0 equivalents of the reducer demonstrated to be the most effective, affording an 85 % yield (entries 2-3, table 3). Considering these results and taking in mind the cost of the reducer, the use of one equivalent of tin(II) chloride dihydrate (entry 2, table 3) was selected to further analyze the influence of hydrochloric acid in the range between 0.0 to 50.0 equivalents (entries 2 and 6-11, table 3).

Table 2. Temperature, reaction time and solvent optimization on the formation of 3-substituted 2,1-benzisoxazole **4b**.



Entry	T (°C)	Time (min)	Solvent	Yield (%)
1	rt	120	MeOH	43
2	50	120	MeOH	61
3	Reflux	120	MeOH	82
4	Reflux	120	EtOH	80
5	Reflux	120	H ₂ O	55
6	Reflux	120	BuOH	57
7	Reflux	120	1,4-Dioxane	61
8	Reflux	120	THF	85
9	Reflux	240	THF	82
10	Reflux	30	THF	85
11	Reflux	15	THF	85
12	Reflux	10	THF	83
13	Reflux	5	THF	80

The presence of hydrochloric acid revealed to be crucial for the success of the reaction regarding the poor 5 % of yield obtained in the absence of hydrochloric acid (entry 6, table 3). In fact, this yield significantly increased as the hydrochloric acid number of equivalents rises until an excellent 87 % yield when ten equivalents were used (entry 10, table 3). Apparently, a further increase to fifty equivalents of hydrochloric acid did not present any advantage since the yield decay from 87 to 85 and 72 % (entries 2 and 10-11, table 3).

Table 3. Tin(II) chloride dihydrate and hydrochloric acid equivalents optimization on the formation of 3-substituted 2,1-benzisoxazole **4b**.

3b $\xrightarrow[\text{THF, reflux, 15 min.}]{\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O, HCl}}$ **4b**

Entry	SnCl ₂ ·2H ₂ O (equivalents)	HCl (equivalents)	Yield (%)
1	0.5	15.0	40
2	1.0	15.0	85
3	2.0	15.0	85
4	3.0	15.0	62
5	5.0	15.0	26
6	1.0	0.0	5
7	1.0	0.1	12
8	1.0	1.0	18
9	1.0	5.0	75
10	1.0	10.0	87
11	1.0	50.0	72

By applying the optimized reactional conditions above described, we then extended the reaction scope to a set of ten 3-substituted 2,1-benzisoxazoles **4a-j**, six of them (**4d-e** and **4g-j**) were never been described, where the asymmetric nature of the (thio)barbituric acid moiety was for the first time explored (table 4).

Table 4 – Scope of 3-substituted 2,1-benzisoxazoles **4**.

Entry	4	X	R ₁	R ₂	Yield (%)
1	a	O	H	H	87 (79) ^a
2	b	S	H	H	87 (82) ^a
3	c	O	Me	Me	84 (51) ^a
4	d	S	Me	Me	84
5	e	O	Ph	Ph	70
6	f	S	Ph	Ph	73 (67) ^a
7	g	S	Ph	3-ClC ₆ H ₄	40
8	h	S	Ph	4-ClC ₆ H ₄	67
9	i	S	Ph	4-FC ₆ H ₄	65
10	j	S	Ph	4-IC ₆ H ₄	60

^a Previously described obtained by previous no optimized method [4a].

For this purpose, the starting materials *N,N*-disubstituted thioureas **1a-d** and 1,3-diphenylurea (**1e**) were prepared as already described in the literature [4a, 8]. Then, by condensation with malonic acid in the presence of phosphoryl chloride [9] or

acetyl chloride [4a], the starting barbituric and thiobarbituric acids **2d-j** were obtained (table 5).

Table 5. Scope of barbituric and thiobarbituric acids **2** and 5-(2-nitrobenzylidene) barbiturates and thiobarbiturates **3**.

Entry	2 and 3a-j	X	R ₁	R ₂	Yield of 2 (%)	Yield of 3 (%)
1	a	O	H	H	^a	97
2	b	S	H	H	^a	90
3	c	O	Me	Me	^a	97
4	d	S	Me	Me	70	83
5	e	O	Ph	Ph	65	82
6	f	S	Ph	Ph	95	90
7	g	S	Ph	3-ClC ₆ H ₄	60	48
8	h	S	Ph	4-ClC ₆ H ₄	78	91
9	i	S	Ph	4-FC ₆ H ₄	71	91
10	j	S	Ph	4-IC ₆ H ₄	68	93

^a Purchased from commercially sources.

To the best of our knowledge, the 1,3-disubstituted thiobarbituric acids **2d** and **2g-j** have not been reported to date. These were successfully synthesized with good yields (60-78 %) after ethanol recrystallization. Afterwards, (thio)barbiturates **2a-j** were subjected to a Knoevenagel condensation with 2-nitrobenzaldehyde in water [4a] to afford ten 5-(2-nitrobenzylidene)(thio)barbiturates **3a-j** (table 5), six of them (**3d-e** and **3g-j**) are new, in very good yields from 82 to 97 %, with exception of the asymmetric derivative 3-chlorine **3g** (48 % yield).

Finally, the 5-(2-nitrobenzylidene)(thio)barbiturates **3a-j** were submitted to reductive heterocyclization using the optimized reactional conditions presented above to afford compounds **4a-j** (table 4). Interestingly, the 3-substituted 2,1-benzisoxazoles **4a-c** and **4f** previously described were obtained in higher yields than before [4a], concretely from 51-82 % to 73-87 % (entries 1-3 and 6, table 4). The remaining new 2,1-benzisoxazoles **4d-e** and **4g-j** were synthesized in moderate to good yields, between 40 and 84 % (entries 4-5 and 7-10, table 4).

In general, the yields of 2,1-benzisoxazoles **4** resulting from the reduction of the 5-(2-nitrobenzylidene)(thio)barbiturates **3** seem to be more dependent on the R₁ and R₂ nature than of the chalcogen X nature (table 4). However, some more examples must be analyzed in order to take stronger conclusions depicted below. As representative examples, the yields of symmetric benzisoxazoles (entries 1-6, table 4) are almost the same within each serial where the chalcogen differed from oxygen to sulphur (**4a-b**, 87 %; **4c-d**, 84 %; **4e** and **4f**, 73 and 70 %, table 4). Contrariwise, the yields seem to be steric hindrance dependent and therefore favored when the substituents R₁ and R₂ groups are smaller. In fact, the 87 and 84 % better yields were obtained when hydrogen or methyl group were present (entries 1-2 and 3-4, table 4) when compared to 73 and 70 % obtained for phenyl group cases (entries 5 and 6, table 4). Besides, asymmetric 3-substituted 2,1-benzisoxazoles **4** were generally obtained in lower yields, ranging from 40 to 67 % (entries 7-10, table 4). While the nature of the halogen in the phenyl substituent seems to not influence the yields (entries 8-10, table 4), the substitution in the *para* position (67%; entry 8, table 4) seems to be favored in relation to their *meta* congener (40%; entry 9, table 4).

3. Conclusion

Several symmetric and asymmetric 3-substituted 2,1-benzisoxazoles from 5-(2-nitrobenzylidene)(thio)barbiturates were successfully synthesized and some of them are described for the first time. The reactional conditions for their synthesis were optimized and involved the reflux for 15 minutes of a stirred mixture containing tin(II) chloride dihydrate (1,0 equivalent), concentrated hydrochloric acid (1,0 equivalent) and starting 5-(2-nitrobenzylidene)pyrimidines in THF (20 mL). The work-up was very simple and involved the filtration and washing the product so formed with diethyl ether and after cooling the final yields ranged from 40 to 87%. In general, the yields of these 2,1-benzisoxazoles seems to be more dependent on the R₁ and R₂ nature of the pyrimidine system than of the chalcogen X nature.

As 2,1-benzisoxazoles are relevant synthetic precursors and are associated to relevant bioactivities, this procedure can find large interest in the future in organic and medicinal chemistry fields.

4. Experimental section

4.1. General experimental details

Reagents and solvents were purchased from standard sources and used without purification. All reactions were performed in the one mmol scale and were monitored by thin-layer

chromatography (TLC) on Macherey-Nagel 60 G/UV₂₅₄ (0.2 mm) plates which were visualized by ultra-violet (UV) light detection (254 nm). Melting points (mp) were measured in open capillary tubes in a Büchi B-540 apparatus and were uncorrected. NMR spectra were acquired at room temperature on a Bruker Avance III 400 MHz spectrometer (¹H NMR at 400.13 MHz and ¹³C NMR at 100.62 MHz) and were processed with the software MestReNova 11.0.3 (trial). Deuterated dimethylsulfoxide (DMSO-*d*₆) and chloroform (CDCl₃) were used as solvents and as an internal standard (DMSO-*d*₆: δ_H = 2.50 and δ_C = 39.52, or CDCl₃: δ_H = 7.26 and δ_C = 77.16). The chemical shift (δ) values are given in parts per million (ppm), and the coupling constants (*J*) are given in Hertz (Hz). The ¹H and ¹³C spectra of all new 2,1-benzisoxazoles **4d-e** and **4g-j** were present on Supplementary Material. High resolution mass spectrometry (HRMS) was performed for new compounds at CACTI services, University of Vigo, Spain.

4.2. Synthesis of 1,3-disubstitutedthiureas **1f-j**

As already described [4a], to a stirred solution of phenylisothiocyanate (1.0 mmol, 137.9 mg, 121.9 μL) in dichloromethane (0.5 mL) at room temperature, was added dropwise a solution of the respective aniline (1.0 mmol) in dichloromethane (0.5 mL). The reaction was followed by TLC (dichloromethane). The suspension so formed was filtered and washed with ethyl ether to afford the corresponding 1,3-disubstitutedthiureas.

4.2.1. 1,3-Diphenylthiourea (**1f**)

From aniline (1.0 mmol, 93.1 mg, 91.3 μL); white crystals (223.7 mg, 95 %); mp 142-144 °C (lit. 140-142 °C [10]); ¹H NMR and ¹³C NMR spectral data of the product were compared to those of authentic sample [4a].

4.2.2. 1-(3-chlorophenyl)-3-phenylthiourea (**1g**)

From 3-chloroaniline (1.0 mmol, 127.6 mg, 105.8 μL); white solid (126.1 mg, 97 %); mp 100-101 °C (lit. 104 °C [11]); ¹H NMR and ¹³C NMR spectral data of the product were compared to those of authentic sample [11].

4.2.3. 1-(4-chlorophenyl)-3-phenylthiourea (**1h**)

From 4-chloroaniline (1.0 mmol, 130.2 mg); white solid (254.9 mg, 97 %); mp 156-157 °C (lit. 150 °C [11]); ¹H NMR and ¹³C NMR spectral data of the product were compared to those of authentic sample [11].

4.2.4. 1-(4-fluorophenyl)-3-phenylthiourea (**1i**)

From 4-fluoroaniline (1.0 mmol, 112.3 mg, 95.7 μL); white solid (220.8 mg, 90 %); mp 171-172 °C (lit. 173-174 °C [11]); ¹H NMR and ¹³C NMR spectral data of the product were compared to those of authentic sample [11].

4.2.5. 1-(4-iodophenyl)-3-phenylthiourea (**1j**)

From 4-iodoaniline (1.0 mmol, 223.5 mg); white solid (336.5 mg, 95 %); 168-169 °C (lit. 170 °C [12]); ¹H NMR and ¹³C NMR spectral data of the product were compared to those of authentic sample [12].

4.3. Synthesis of 1,3-diphenylurea (**1e**)

Adapted from the method already described [8]. To a suspension of aniline (2.0 mmol; 187.2 mg; 183.2 μL) in water (5 mL) at room temperature, carbonyldiimidazole (1 mmol; 167.2 mg) was added. The reaction was followed by TLC (dichloromethane) and completed in 4 h. The resulting suspension was filtered and washed with diethyl ether to yield the title compound as a white solid (180.4 mg, 85 %); mp 239-240 °C (lit. 250-255 °C [13]); ¹H NMR and ¹³C NMR spectral data of the product were compared to those of authentic sample [13].

4.4. Synthesis of 1,3-disubstituted(thio)barbituric acids **2d-j**

According to the already described methods A [9] or B [4a]:

Method A: To a solution of respective 1,3-disubstituted(thio)urea (1.0 mmol) and malonic acid (1.0 mmol, 105.1 mg) in chloroform (5 mL), phosphoryl chloride (2.0 mmol, 309.8 mg, 188.3 μ L) was added dropwise. The solution was heated at 50 °C and the reaction was followed by TLC (dichloromethane). The solvent was removed at reduced pressure, water was added (10 mL) and solid obtained was filtered, dried and recrystallized from ethanol.

Method B: A stirred solution of respective 1,3-disubstituted(thio)urea (1.0 mmol), malonic acid (1.3 mmol, 136.6 mg) and acetyl chloride (3.0 mmol, 240.3 mg, 217.7 μ L) was heated at 60 °C and the reaction was followed by TLC (dichloromethane). Water was added to the obtained mixture and the solid was filtered, washed with water and recrystallized from ethanol.

4.4.1. 1,3-Dimethylthiobarbituric acid (**2d**)

From 1,3-dimethylthiourea (1.0 mmol, 105.2 mg) by method A; yellow solid (120.5 mg, 70 %); mp 193-194 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) (s, 2H), 3.67 (s, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 181.6, 163.6, 40.4, 35.5.

4.4.2. 1,3-Diphenylbarbituric acid (**2e**)

From **1e** (1.0 mmol, 212.3 mg) by method A; yellow solid (182.2 mg, 65 %); mp 241-242 °C (lit. 222-223 °C [14]); ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data of the product were compared to those of authentic sample [14].

4.4.3. 1,3-Diphenylthiobarbituric acid (**2f**)

From **1f** (1.0 mmol, 228.3 mg) by method B; yellow needles (281.5 mg, 95 %); mp 252-253 °C (lit. 258-259 °C [15]); ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data of the product were compared to those of authentic sample [4a].

4.4.4. 1-(3-chlorophenyl)-3-phenylthiobarbituric acid (**2g**)

From **1g** (1.0 mmol, 262.8 mg) by method B; beige solid (199.0 mg, 60%); mp 205-207 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.56 – 7.38 (m, 5H), 7.24 (s, 2H), 7.24 – 7.18 (m, 2H), 4.11 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 181.2, 163.1, 139.6, 138.6, 135.3, 130.6, 129.8, 129.6, 129.4, 129.3, 128.7, 127.2, 41.2.

4.4.5. 1-(4-chlorophenyl)-3-phenylthiobarbituric acid (**2h**)

From **1h** (1.0 mmol, 292.8 mg) by method B; light yellow solid (258.0 mg, 78 %); mp 259-260 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.52 – 7.44 (m, 5H), 7.21 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.16 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 4.11 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 181.4, 163.2, 163.1, 138.7, 137.1, 135.3, 130.1, 130.1, 129.8, 129.3, 128.6, 41.2.

4.4.6. 1-(4-fluorophenyl)-3-phenylthiobarbituric acid (**2i**)

From **1i** (1.0 mmol, 246.3 mg) by method B; light yellow solid (223.2 mg, 71 %); mp 238-239 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.55 – 7.44 (m, 3H), 7.24 – 7.15 (m, 6H), 4.11 (s, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 181.7, 163.4, 163.2, 138.7, 130.6, 130.5, 129.8, 129.3, 128.6, 117.0, 116.7, 41.2.

4.4.7. 1-(4-iodophenyl)-3-phenylthiobarbituric acid (**2j**)

From **1j** (1.0 mmol, 354.2 mg) by method B; beige solid (287.1 mg, 68 %); mp 230-231 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.84 (dd, J = 16.7, 8.6 Hz, 2H), 7.59 – 7.44 (m, 3H), 7.24 (dd, J = 24.5, 7.9 Hz, 2H), 6.99 (dd, J = 24.5, 8.6 Hz, 2H), 4.12 (d, J = 5.8 Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 181.3, 163.2, 163.1, 139.0, 130.6, 129.8, 129.8, 129.8, 129.3, 128.6, 128.6, 41.2.

4.5. 5-(2-Nitro-benzylidene)pyrimidines **3a-j**

A stirred mixture of respective (thio)barbituric acid **2a-j** (1.0 mmol) and 2-nitrobenzaldehyde (1.0 mmol, 154.2 mg) in water (5 mL) was refluxed for 2 hours. The product so formed after cooling was filtered, washed with water, ethanol and ethyl ether to afford the following 5-(2-nitro-benzylidene)pyrimidines:

4.5.1. 5-(2-Nitrobenzylidene)pyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione (**3a**)

From barbituric acid (1.0 mmol, 130.7 mg, **1a**); white solid (253.3 mg, 97 %); mp 274-275 °C (literature 274-276 °C) [19]. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data of the product were compared to those of authentic sample [4a].

4.5.2. 5-(2-Nitrobenzylidene)-2-thioxodihydropyrimidine-4,6(1H,5H)-dione (**3b**)

From thiobarbituric acid (1.0 mmol, 147.1 mg, **2b**); pale yellow solid (249.5 mg, 90 %); mp 239-241 °C (literature 246-250 °C [17]). ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data of the product were compared to those of authentic sample [4a].

4.5.3. 1,3-dimethyl-5-(2-nitrobenzylidene)dihydropyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione (**3c**)

From 1,3-dimethylbarbituric acid (1.0 mmol, 159.3 mg, **2c**); white solid (280.6 mg, 97 %); mp 158-159 °C (literature 159-161 °C [18]). ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data of the product were compared to those of authentic sample [4a].

4.5.4. 1,3-dimethyl-5-(2-nitrobenzylidene)-2-thioxodihydropyrimidine-4,6(1H,5H)-dione (**3d**)

From **2d** (1.0 mmol, 172.2 mg); light brown solid (253.4 mg, 83 %); mp 161-162 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 8.78 (s, 1H), 8.28 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.83 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.72 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.48 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 180.9, 160.1, 158.6, 155.8, 146.14, 134.0, 132.0, 130.4, 130.0, 124.1, 120.5, 35.5, 35.0.

4.5.5. 5-(2-nitrobenzylidene)-1,3-diphenylpyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione (**3e**)

From **2e** (1.0 mmol, 280.3 mg); white solid (338.9 mg, 82 %); mp 239-240 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 8.82 (s, 1H), 8.25 (dd, J = 8.2 and 1.2 Hz, 1H), 7.82 (td, J = 7.6 and 1.2 Hz, 1H), 7.71-7.61 (m, 2H), 7.57-7.50 (m, 2H), 7.49-7.36 (m, 6H), 7.34-7.27 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 161.9, 160.6, 154.6, 151.1, 146.7, 136.0, 135.6, 134.5, 132.4, 130.7, 130.5, 129.4, 129.3, 129.3, 129.0, 128.9, 124.6, 121.5.

4.5.6. 5-(2-Nitrobenzylidene)-1,3-diphenyl-2-thioxodihydropyrimidine-4,6(1H,5H)-dione (**3f**)

From **2f** (1.0 mmol, 296.4 mg); pale orange solid (386.5 mg, 90%); mp 235 °C decomposes (literature 232°C [18]). ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data of the product were compared to those of authentic sample [4a].

4.5.7. 1-(3-chlorophenyl)-5-(2-nitrobenzylidene)-3-phenyl-2-thioxodihydropyrimidine-4,6(1H,5H)-dione (**3g**)

From **2g** (1.0 mmol, 330.8 mg); orange solid (222.8 mg, 48 %); mp 227-229 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm)

8.84 (s, 1H), 8.25 (dd, $J = 8.1, 2.8$ Hz, 1H), 7.86 – 7.78 (m, 1H), 7.74 – 7.62 (m, 2H), 7.56 – 7.48 (m, 2H), 7.47 – 7.30 (m, 6H), 7.31 – 7.20 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 181.2, 160.3, 160.2, 158.8, 158.7, 155.5, 155.4, 146.2, 146.2, 141.2, 140.9, 139.8, 139.5, 134.1, 133.1, 132.9, 131.7, 130.5, 130.5, 130.2, 130.0, 129.1, 129.0, 128.8, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 127.9, 124.2, 121.1, 121.0.

4.5.8. 1-(4-chlorophenyl)-5-(2-nitrobenzylidene)-3-phenyl-2-thioxodihydropyrimidine-4,6(1H,5H)-dione (3h)

From **2h** (1.0 mmol, 330.8 mg); beige solid (422.2 mg, 91 %); mp 238-239 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 8.82 (s, 1H), 8.25 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.81 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.68 (t, $J = 9.1$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.54 – 7.45 (m, 2H), 7.45 – 7.20 (m, 7H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 181.3, 160.3, 160.3, 158.8, 158.8, 155.3, 146.2, 139.9, 139.6, 138.9, 138.6, 134.1, 132.9, 132.8, 131.7, 131.7, 130.8, 130.8, 130.5, 130.5, 130.2, 130.1, 129.2, 129.1, 129.1, 129.0, 128.8, 128.4, 128.2, 124.2, 121.2, 121.2.

4.5.9. 1-(4-fluorophenyl)-5-(2-nitrobenzylidene)-3-phenyl-2-thioxodihydropyrimidine-4,6(1H,5H)-dione (3i)

From **2i** (1.0 mmol, 314.4 mg); beige solid (407.2 mg, 91 %); mp 249-250 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 8.82 (s, 1H), 8.25 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.81 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.68 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.50 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.45 – 7.20 (m, 9H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 181.6, 160.4, 160.3, 158.9, 158.8, 155.2, 146.2, 140.0, 139.7, 136.3, 136.2, 136.0, 135.9, 134.1, 131.7, 131.0, 131.0, 130.9, 130.9, 130.5, 130.5, 130.2, 130.1, 129.1, 128.9, 128.8, 128.3, 128.2, 124.2, 121.2, 121.2, 116.1, 115.9, 115.9, 115.7.

4.5.10. 1-(4-iodophenyl)-5-(2-nitrobenzylidene)-3-phenyl-2-thioxodihydropyrimidine-4,6(1H,5H)-dione (3j)

From **2j** (1.0 mmol, 422.3 mg); light brown solid (516.5 mg, 93 %); mp 193-194 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 8.82 (s, 1H), 8.28 – 8.22 (m, 1H), 7.89 – 7.86 (m, 1H), 7.85 – 7.63 (m, 5H), 7.61 – 7.31 (m, 4H), 7.28 – 7.16 (m, 2H), 7.11 – 7.02 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 181.2, 160.3, 158.8, 155.3, 146.2, 139.9, 139.6, 138.1, 137.9, 134.1, 131.3, 130.2, 129.1, 129.0, 128.8, 128.4, 128.2, 124.2, 121.2.

4.6. 5-(Benzisoxazol-3-ylidene)pyrimidines 4a-j

To a solution of appropriated 5-(2-nitrobenzylidene)pyrimidine **3a-j** (1.0 mmol) and tin(II) chloride dihydrate (1.0 mmol, 225.9 mg) in THF (20 mL), concentrated hydrochloric acid (10.0 mmol, 974.2 mg, 811.8 μL) was added and refluxed for 15 minutes. After cooling, the solid was filtered and washed with diethyl ether to give the following 5-(benzisoxazol-3-ylidene)pyrimidines:

4.6.1. 5-(benzo[c]isoxazol-3(1H)-ylidene)pyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione (4a)

From **3a** (1.0 mmol, 261.2 mg); yellow solid (213.3 mg, 87 %); mp 266-268 °C decomposes; ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data of the product were compared to those of authentic sample [4a].

4.6.2. 5-(benzo[c]isoxazol-3(1H)-ylidene)-2-thioxodihydropyrimidine-4,6(1H,5H)-dione (4b)

From **3b** (1.0 mmol, 277.3 mg); yellow solid (227.3 mg, 87 %); mp 207-208 °C decomposes; ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data of the product were compared to those of authentic sample [4a].

4.6.3. 5-(benzo[c]isoxazol-3(1H)-ylidene)-1,3-dimethylpyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione (4c)

From **3c** (1.0 mmol, 289.3 mg); yellow solid (229.5 mg, 84 %); mp 211-213 °C; ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data of the product were compared to those of authentic sample [4a].

4.6.4. 5-(benzo[c]isoxazol-3(1H)-ylidene)-1,3-dimethyl-2-thioxodihydropyrimidine-4,6(1H,5H)-dione (4d)

From **3d** (1.0 mmol, 305.3 mg); yellow solid (243.1 mg, 84 %); mp 218-219 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 7.76 (dt, $J = 8.8, 1.1$ Hz, 1H), 7.38 (dt, $J = 9.0, 1.0$ Hz, 1H), 7.23 (ddd, $J = 9.0, 6.3, 1.1$ Hz, 1H), 6.76 (ddd, $J = 8.8, 6.3, 0.9$ Hz, 1H), 3.61 (s, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 177.1, 166.5, 159.2, 156.2, 130.4, 125.1, 119.8, 114.8, 113.3, 84.7, 34.9; HRMS (EI-TOF): calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}]^+$ 289.0521; found 289.0528.

4.6.5. 5-(benzo[c]isoxazol-3(1H)-ylidene)-1,3-diphenylpyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione (4e)

From **3e** (1.0 mmol, 413.4 mg); yellow solid (278.2 mg, 70 %); mp 264-265 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 7.83 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.41 (t, $J = 7.8$ Hz, 4H), 7.35 – 7.29 (m, 3H), 7.29 – 7.25 (m, 4H), 7.20 (dd, $J = 8.9, 6.3$ Hz, 1H), 6.69 (dd, $J = 8.8, 6.2$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 167.5, 160.8, 156.0, 151.7, 137.5, 130.4, 129.8, 128.3, 127.2, 125.8, 119.0, 114.1, 112.9, 82.1; HRMS (EI-TOF): calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}]^+$ 397.1063; found 397.1073.

4.6.6. 5-(benzo[c]isoxazol-3(1H)-ylidene)-1,3-diphenyl-2-thioxodihydropyrimidine-4,6(1H,5H)-dione (4f)

From **3f** (1.0 mmol, 429.5 mg); yellow solid (301.8 mg, 73 %); mp 255-256 °C; ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data of the product were compared to those of authentic sample [4a].

4.6.7. 5-(benzo[c]isoxazol-3(1H)-ylidene)-1-(3-chlorophenyl)-3-phenyl-2-thioxodihydropyrimidine-4,6(1H,5H)-dione (4g)

From **3g** (1.0 mmol, 463.9 mg); yellow solid (180.0 mg, 40 %); mp 250-252 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 7.78 (dd, $J = 8.8, 1.2$ Hz, 1H), 7.46 – 7.32 (m, 6H), 7.29 (tt, $J = 7.3, 1.8, 1.4$ Hz, 1H), 7.25 – 7.17 (m, 4H), 6.71 (dd, $J = 8.9, 6.2$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 178.3, 166.0, 159.5, 159.4, 156.2, 143.2, 141.7, 132.5, 130.2, 129.9, 129.8, 129.5, 128.7, 128.4, 127.1, 127.0, 125.3, 119.3, 114.3, 113.1, 85.3; HRMS (EI-TOF): calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}]^+$ 447.0444; found 447.0447.

4.6.8. 5-(benzo[c]isoxazol-3(1H)-ylidene)-1-(4-chlorophenyl)-3-phenyl-2-thioxodihydropyrimidine-4,6(1H,5H)-dione (4h)

From **3h** (1.0 mmol, 463.9 mg); yellow solid (300.1 mg, 67 %); mp 248-249 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 7.78 (dt, $J = 8.8, 1.1$ Hz, 1H), 7.48 – 7.36 (m, 4H), 7.34 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.32 – 7.24 (m, 3H), 7.24 – 7.17 (m, 3H), 6.71 (dd, $J = 8.9, 6.2$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 178.4, 166.1, 159.5, 159.4, 156.1, 141.7, 140.8, 131.6, 131.5, 130.3, 129.5, 128.5, 128.4, 127.0, 125.3, 119.4, 114.3, 113.1, 85.3; HRMS (EI-TOF): calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}]^+$ 447.0444; found 447.0447.

4.6.9. 5-(benzo[c]isoxazol-3(1H)-ylidene)-1-(4-fluorophenyl)-3-phenyl-2-thioxodihydropyrimidine-4,6(1H,5H)-dione (4i)

From **3i** (1.0 mmol, 447.5 mg); yellow solid (280.4 mg, 65 %); mp 249-250 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 7.78 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.39 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.37 – 7.15 (m, 9H), 6.71 (dd, $J = 8.9, 6.3$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-

d_6) δ (ppm) 178.8, 166.3, 162.2, 159.8, 159.6, 156.1, 141.8, 138.1, 138.1, 131.6, 131.5, 130.4, 129.6, 128.5, 127.0, 125.4, 119.5, 115.4, 115.1, 114.4, 113.1, 85.5; HRMS (EI-TOF): calcd. for $C_{23}H_{14}FN_3O_3S$ $[M]^+$ 431.0740; found 431.0751.

4.6.10. 5-(benzo[*c*]isoxazol-3(1*H*)-ylidene)-1-(4-iodophenyl)-3-phenyl-2-thioxodihydropyrimidine-4,6(1*H*,5*H*)-dione (4j)

From **3j** (1.0 mmol, 555.4 mg); yellow solid (323.6 mg, 60 %); mp 258-259 °C; 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 7.75 (t, J = 9.4 Hz, 3H), 7.39 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.32 (dd, J = 15.8, 8.1 Hz, 2H), 7.21 (d, J = 7.5 Hz, 3H), 7.05 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.71 (t, J = 7.5 Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 178.3, 166.1, 159.5, 159.3, 156.1, 141.8, 141.7, 137.3, 132.1, 130.2, 129.5, 128.4, 127.0, 125.3, 119.3, 114.3, 113.1, 92.9, 85.3; HRMS (EI-TOF): calcd. for $C_{23}H_{14}IN_3O_3S$ $[M]^+$ 538.9801; found 538.9818.

Acknowledgements

This work is supported by FEDER funds through the POCI - COMPETE 2020 - Operational Programme Competitiveness and Internationalization in Axis I - Strengthening research, technological development and innovation (Project No. 007491) and National Funds by FCT - Foundation for Science and Technology (Project UID/Multi /00709). J. L. Serrano and J. Figueiredo acknowledge a fellowship from Santander-Totta/UBI (BID/ICI-UID FC/Santander Universidades-UBI/2017).

References

- [1] Banerjee, B., Recent developments on ultrasound-assisted one-pot multicomponent synthesis of biologically relevant heterocycles. *Ultrasonics Sonochemistry*, 35 (2017), 15-35.
- [2] (a) Shaker Raafat, M.; Ishak Esam, A., Barbituric Acid Utility in Multi-Component Reactions. In *Zeitschrift für Naturforschung B*, 2011; Vol. 66, p 1189; (b) Mohammadi Ziarani, G.; Aleali, F.; Lashgari, N., Recent applications of barbituric acid in multicomponent reactions. *RSC Advances*, 6 (2016), 50895-50922; (c) Lopez-Munoz, F.; Ucha-Udabe, R.; Alamo, C., The history of barbiturates a century after their clinical introduction. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 1 (2005), 329-43; (d) Figueiredo, J.; Serrano, J. L.; Cavalheiro, E.; Keurulainen, L.; Yli-Kauhaluoma, J.; Moreira, V. M.; Ferreira, S.; Domingues, F. C.; Silvestre, S.; Almeida, P., Trisubstituted barbiturates and thiobarbiturates: Synthesis and biological evaluation as xanthine oxidase inhibitors, antioxidants, antibacterial and anti-proliferative agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143 (2018), 829-842.
- [3] (a) Yoshikazu, U., 1, 2-Benzisoxazole: A Privileged Structure with a Potential for Polypharmacology. *Current Pharmaceutical Design*, 22 (2016), 3201-3211; (b) Rakesh, K. P.; Shantharam, C. S.; Sridhara, M. B.; Manukumar, H. M.; Qin, H.-L., Benzisoxazole: a privileged scaffold for medicinal chemistry. *MedChemComm*, 8 (2017), 2023-2039.
- [4] (a) Serrano, J. L.; Cavalheiro, E.; Barroso, S.; Romão, M. J.; Silvestre, S.; Almeida, P., A synthetic route to novel 3-substituted-2,1-benzisoxazoles from 5-(2-nitrobenzylidene)(thio)barbiturates. *Comptes Rendus Chimie*, 20 (2017), 990-995; (b) Więclaw, M.; Bobin, M.; Kwast, A.; Bujok, R.; Wróbel, Z.; Wojciechowski, K., General synthesis of 2,1-benzisoxazoles (anthranils) from nitroarenes and benzylic C-H acids in aprotic media promoted by

- combination of strong bases and silylating agents. *Molecular Diversity*, 19 (2015), 807-816.
- [5] Friedländer, P.; Henriques, R., Zur Reduktion des Orthonitrobenzaldehyds. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 15 (1882), 2105-2110.
 - [6] (a) Budruev, A. V.; Dzhons, D. Y., Synthesis of 2,1-benzisoxazoles (microreview). *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 52 (2016), 441-443; (b) Kotov, A. D.; Prokashnikov, M. A.; Antonova, E. A.; Rusakov, A. I., Synthesis of Nitrogen-Containing Heterocycles from Nitroarenes (Minireview). *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 50 (2014), 647-657.
 - [7] (a) Krüger, S.; Meier, C., Synthesis of Site-Specific Damaged DNA Strands by 8-(Acetylaryl amino)-2'-deoxyguanosine Adducts and Effects on Various DNA Polymerases. *European Journal of Organic Chemistry*, 2013 (2013), 1158-1169; (b) Ren, P.-D.; Pan, X.-W.; Jin, Q.-H.; Yao, Z.-P., Reduction of Nitroarenes to N-Arylhydroxylamines with KBH₄/BiCl₃ System. *Synthetic Communications*, 27 (1997), 3497-3503; (c) Bordwell, F. G.; Liu, W.-Z., Equilibrium Acidities and Homolytic Bond Dissociation Energies of N-H and/or O-H Bonds in N-Phenylhydroxylamine and Its Derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, 118 (1996), 8777-8781; (d) Wurz, R. P.; Charette, A. B., An Expedient and Practical Method for the Synthesis of a Diverse Series of Cyclopropane α -Amino Acids and Amines. *The Journal of Organic Chemistry*, 69 (2004), 1262-1269; (e) Lin, Y.-I.; Lang, S. A., Selective reduction of nitro-heterocycles with sodium sulfide in aqueous p-dioxane. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 17 (1980), 1273-1275.
 - [8] Padiya, K. J.; Gavade, S.; Kardile, B.; Tiwari, M.; Bajare, S.; Mane, M.; Gaware, V.; Varghese, S.; Harel, D.; Kurhade, S., Unprecedented "In Water" Imidazole Carbonylation: Paradigm Shift for Preparation of Urea and Carbamate. *Organic Letters*, 14 (2012), 2814-2817.
 - [9] Whiteley, M. A., CXXIII.—Studies in the barbituric acid series. I. 1: 3-Diphenylbarbituric acid and some coloured derivatives. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 91 (1907), 1330-1350.
 - [10] Wang, F.; Zhao, P.; Xi, C., Copper-catalyzed one-pot synthesis of 2-thioxo-2, 3-dihydroquinazolin-4 (1*H*)-ones from ortho-bromobenzamides and isothiocyanates. *Tetrahedron letters*, 52 (2011), 231-235.
 - [11] Singh, K.; Sharma, S., An isocyanide based multi-component reaction under catalyst- and solvent-free conditions for the synthesis of unsymmetrical thioureas. *Tetrahedron Letters*, 58 (2017), 197-201.
 - [12] Koshti, V. S.; Thorat, S. H.; Gote, R. P.; Chikkali, S. H.; Gonnade, R. G., The impact of modular substitution on crystal packing: the tale of two ureas. *CrystEngComm*, 18 (2016), 7078-7094.
 - [13] Mohammadi, L.; Zolfigol, M. A.; Khazaei, A.; Yarie, M.; Ansari, S.; Azizian, S.; Khosravi, M., Synthesis of nanomagnetic supported thiourea-copper(I) catalyst and its application in the synthesis of triazoles and benzamides. *Applied Organometallic Chemistry*, 32 (2018), e3933.
 - [14] Manick, A.-D.; Berhal, F.; Prestat, G., Development of a One-Pot Four C-C Bond-Forming Sequence Based on Palladium/Ruthenium Tandem Catalysis. *Organic Letters*, 20 (2018), 194-197.

[15] Botsi, S.; Tsolomitis, A., One or two step acid mediated
cyclocondensation process for the preparation of 5-carbethoxy-2-

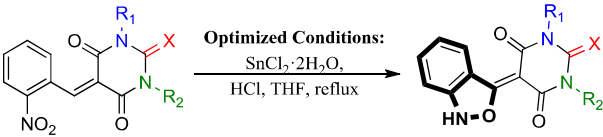
thiouracils from diethyl ethoxymethylenemalonate and thioureas.
Heterocyclic Communications, 13 (2007), 229-234.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Graphical Abstract

The synthesis and process optimization of symmetric and asymmetric 3-substituted 2,1-benzisoxazoles from 5-(2-nitrobenzylidene)(thio)barbiturates

João L. Serrano, Pedro F. Soeiro, Melani A. Reis, Samuel Silvestre, Renato E. F. Boto and Paulo Almeida



X = O or S; R₁ = H, Me, Ph; R₂ = H, Me, Ph, 3-ClC₆H₄, 4-ClC₆H₄, 4-FC₆H₄, 4-IC₆H₄.

Leave this area blank for abstract info.

Supplementary Material

[Click here to download Supplementary Material: 2,1-Benzisoxazoles Tetrahedron Supplementary Material.docx](#)